



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:**

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**Reologia e Transição de Formas de Lipossomas Elásticos em  
Membranas de Nanoporos**

Mestranda: Luciana Lima de Oliveira

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Helena Andrade Santana

Dissertação de Mestrado apresentado à Faculdade de Engenharia Química para a  
obtenção do título de Mestre em Engenharia Química na Área de Concentração  
Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Campinas - São Paulo

Dezembro - 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -  
UNICAMP

OL41p      Oliveira, Luciana Lima de  
Reologia e transição de formas de lipossomas  
elásticos em membranas de nanoporos/ Luciana Lima de  
Oliveira. --Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Maria Helena Andrade Santana  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Lipossomos. 2. Medicação transcutânea. 3.  
Agentes ativos de superfícies. I. Santana, Maria Helena  
Andrade. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Rheology and transition shapes of elastic liposomes in  
nanopores membranes

Palavras-chave em Inglês: Elastic liposomes, PEG-8L, Transdermal  
transport

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Nelson Eduardo Durán Caballero e Maria Vitória  
Lopes Bentley

Data da defesa: 17/12/2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Luciana Lima de Oliveira e aprovada em 17 de dezembro de 2007 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



---

Profa Dra. Maria Helena Andrade Santana- Orientadora



---

Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero- Membro Titular



---

Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley – Membro Titular

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em  
Engenharia Química.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. H. Landana", is positioned above a horizontal line.

Orientador



E um dia DEUS disse: *“Você passará por muitos espinhos, mas VERÁ que EU estou contigo, que EU sou o teu DEUS...”* (Luciana Lima de Oliveira).

## Dedicatória

### **Dedico este trabalho unicamente e exclusivamente a DEUS, pois...**

...Foi por Ele, que tive o apoio de minha família... Principalmente dos meus pais, Elsa Ana de Lima e Oliveira e Antonio Erivaldo de Oliveira e de meus irmãos Eliane e Evandro, que apesar da distância, estão presentes no coração.

...Foi Ele, quem me presenteou com a amizade, companheirismo, carinho e confiança de Aline Pires, que esteve ao meu lado, dando apoio nos momentos mais difíceis nos últimos anos.

...Foi Ele, quem colocou em minha vida, Gerusa, Aparecida, Zeni, Daene, Marcos e Pastor Hélio para junto comigo, orar e sempre me fazer lembrar que: *maior é o que está em mim, do que o que está no mundo.*

... Foi Ele, quem me preparou este mestrado, assim como já havia preparado a pessoa que me orientou – Professora Maria Helena Andrade Santana, acreditando na minha capacidade e vontade de aprender, crescer e também por estar do meu lado em muitos momentos difíceis da vida.

... Foi Ele, quem me presenteou com pessoas que acreditaram e continuam acreditando em mim! Aqui estão...

...Tio Djalma, tia Gilzélia (titia), tio Rivaldo e tia Maria, pelo amor e carinho.

...Anderson Rojas T. Góes, pela amizade de longos anos.

...Eduardo Hiromitsu Tanabe, pelo carinho.

...Professores do colegial, Olinda, Ercília, Laert, Conceição, Aparecido e Makert.

...Professores da graduação, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Camilo Freddy M. Morejon, Péricles Barbosa Moraes, Almabrouk M. Abogderah, Salah Din Mahmud Hasan, Classius Ferreira da Silva, Márcia Regina Simões, Aparecido Nivaldo Módenes, Edson Antônio da Silva, Conceição de Fátima A. Olguin, Darlou D'Arísbo, Dione Inês Christ, Fernando Palú, Fernando R. E. Quiñones, João Batista O dos Santos, Leonardo S. Guilherme Felipe, Mara Olivier,

Reinaldo Aparecido Bariccatti, Rogério do Nascimento, Sérgio Henrique B. de Faria e Sérgio Luiz de Lucena, pelos ensinamentos, confiança, amizade e por acreditarem no meu potencial.

...Emerson Dal Bem, pela colaboração, carinho e confiança.

...Emilene Baquette Mendes, Denis Vilas Boas, Catarina Correa, Cristiane Valquíria Diunizio, Gilson Maia Barbosa Júnior, Thiago Gomes Pinelli, César Fraia (*in memorian*), Roque Alexandre Mendes, Charles Peterson, pela amizade tão sincera, carinho, confiança e pelos bons momentos.

...Aleksander Rogério Trevizan, pelo carinho e pela presença em muitos momentos em que precisei de um amigo.

...Oscar Eduardo Gamboa Sánchez, pela amizade, carinho e pelas palavras lindas.

...Alessandro Lucindo, Reginaldo César Silvestrini, Maria Gilvanira Gomes da Silva e Ana Lúcia Gonella, pela amizade e bons momentos.

...Rosa Maria Moretti, pela amizade e disponibilidade de sempre.

## **Agradecimentos**

**Agradeço unicamente a Deus por preparar cada um dos apoios que aqui estão:**

Prof. César Santana, pelo concedimento do Laboratório de Propriedades Reológicas e Coloidais da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

Prof<sup>a</sup>. Maria Vitória Bentley, pelo concedimento do Laboratório de Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP - Ribeirão Preto e por fazer parte da banca avaliadora para obtenção de meu título de Mestre em Engenharia Química, pela Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

Prof. Nelson Durán, do Laboratório de Química Biológica – Instituto de Química - UNICAMP, por fazer parte da banca avaliadora para obtenção de meu título de Mestre em Engenharia Química, pela Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

Prof<sup>a</sup>. Eneida de Paula, pelo concedimento do Laboratório de Biomembranas - Faculdade de Biologia - UNICAMP.

Prof. Watson Loh, pelo concedimento do Laboratório de Físico-Química Coloidal e de Superfície - Instituto de Química - UNICAMP.

Prof. Théo Guenter Kieckbusch, pelo concedimento do Laboratório de Engenharia de Produtos e Processos em Biorecursos - Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP.

MSc Uiram Kopcak e mestranda Élide de Castilho Barnabé pela colaboração.

Prof<sup>a</sup>. Maria Elisabete Zaniquelli pelo concedimento do Laboratório do Instituto de Química da USP - Campos de Ribeirão Preto.

Eng<sup>o</sup> Químico Danilo Gasparetto, pela amizade e colaboração.

Prof. Fernando Galembeck do Departamento de Físico-Química - Instituto de Química - UNICAMP.

Carlos Alberto Paula Leite, Departamento de Físico-Química, Instituto de Química da UNICAMP - Laboratório do Prof. Fernando Galembeck - UNICAMP.

Dr<sup>a</sup> Giuliana Piovesan, Dr<sup>a</sup> Fernanda Martins, Dr<sup>a</sup> Lucimara Gaziola de la Torre, Dr<sup>a</sup> Thaís de Paula Rigoletto e Dr<sup>a</sup> Thatyane Morimoto Nobre, pela colaboração.

Colegas do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

Jair Antônio Rodrigues - curso e colégio Alfa de Umuarama – PR – pela amizade e profissionalismo.

Colegas Alan Henrique Mori Bortelho e Vanessa Correa (Santander Banespa), pela alegria e carinho de sempre.

Colegas Luis Felipe Almeida, Dalcir Froidi, Renata Baia, Jamson Rocha, Simone Mezalira Gomes e Antônia Maria F. Lima pelo carinho e amizade.

Funcionários da Secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, Márcia, Evandro, Gabriel e Márcio, pela amizade e disponibilidade de sempre e também à Silvana Margaret pelo carinho e grande ajuda na véspera da defesa desta dissertação.

Agências financiadoras: CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xvi</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>xx</b>
<b>NOMENCLATURA</b>	<b>xxi</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xxiii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xxiv</b>
<b>1.0 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2.0 OBJETIVO</b>	<b>5</b>
<b>3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>6</b>
<b>3.1 Estrutura da Pele</b>	<b>6</b>
<b>3.2 Transporte Transdérmico</b>	<b>8</b>
<b>3.3 Lipossomas</b>	<b>10</b>
<b>3.3.1 Classificação e propriedade dos lipossomas</b>	<b>13</b>
<b>3.4 Tensão Superficial</b>	<b>16</b>
<b>3.5 Tensoativos</b>	<b>18</b>
<b>3.5.1 Incorporação de tensoativos em lipossomas</b>	<b>20</b>
<b>3.6 Lipossomas Elásticos</b>	<b>22</b>
<b>3.7 Escoamento de Fluidos em Meios Porosos</b>	<b>23</b>
<b>3.8 Escoamento de Lipossomas Através de Membranas</b>	<b>26</b>
<b>3.9 Cafeína</b>	<b>30</b>
<b>4.0 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Materiais</b>	<b>34</b>
<b>4.2 Métodos</b>	<b>35</b>
<b>4.2.1 Preparação dos lipossomas convencionais e elásticos</b>	<b>35</b>
<b>4.2.2 Homogeneização de tamanhos</b>	<b>36</b>
<b>4.2.3 Preparação dos lipossomas elásticos</b>	<b>36</b>
<b>4.2.4 Caracterização dos lipossomas</b>	<b>37</b>
<b>4.2.4.1 Quantificação do teor de fosfato</b>	<b>37</b>
<b>4.2.4.2 Distribuição de tamanhos e estabilidade dos</b>	<b>38</b>

lipossomas	
4.2.5 Estimativa do número de lipossomas em solução	39
4.2.6 Medidas de tensão superficial	40
4.2.6.1 Concentração micelar crítica	42
4.2.6.2 Porcentagem de incorporação de PEG-8L	42
4.2.7 Morfologia dos lipossomas	43
4.2.8 Ensaio de permeação	44
4.2.9 Ensaio de permeação <i>in vitro</i> em pele de porco dermatomizada	44
4.2.10 Cafeína	45
4.2.10.1 Extração da cafeína	45
4.2.10.2 Incorporação da cafeína nos lipossomas	45
4.2.10.3 Separação da cafeína não incorporada nos lipossomas	46
4.2.10.4 Quantificação da cafeína incorporada nos lipossomas	46
5.0 Resultados e Discussão	47
5.1 Preparação e Caracterização de Lipossomas Convencionais	47
5.1.1 Rendimento em relação ao teor de fosfato	47
5.1.2 Diâmetro médio e distribuição de tamanhos	47
5.1.3 Morfologia	50
5.1.4 Estabilidade físico-química	52
5.2 Preparação e Caracterização de Lipossomas Elásticos	52
5.2.1 Incorporação do PEG-8L	52
5.2.2 Diâmetro e distribuição de tamanhos	55
5.2.3 Morfologia	61
5.2.4. Tensão superficial	63
5.3 Transição de Formas dos Permeados	64
5.3.1 Diâmetro médio e distribuição de tamanhos	64
5.3.1.1 Lipossomas convencionais	65
5.3.1.2 Solução de PEG-8L	75
5.3.1.3 Lipossomas elásticos na proporção 75:25	85
5.3.1.4 Lipossomas elásticos na proporção 60:40	96
5.3.2 Morfologia	106
5.3.3 Tensão superficial	108

<b>5.4 Teor de Fosfato após Permeação</b>	<b>111</b>
<b>5.5 Reologia de Lipossomas em Membranas de Nanoporos</b>	<b>112</b>
<b>5.5.1 Características da curva de vazão versus pressão e determinação da permeabilidade para a água</b>	<b>112</b>
<b>5.5.2 Características da curva de vazão versus pressão e determinação da permeabilidade para os lipossomas</b>	<b>116</b>
<b>5.6 Influência da Incorporação da Cafeína em Lipossomas Elásticos</b>	<b>124</b>
<b>5.6.1 Quantificação de cafeína no extrato</b>	<b>124</b>
<b>5.6.2 Quantificação de cafeína incorporada</b>	<b>124</b>
<b>5.7 Transição de Formas</b>	<b>125</b>
<b>5.7.1 Solução de cafeína livre</b>	<b>125</b>
<b>5.7.2 Lipossomas elásticos incorporando cafeína</b>	<b>129</b>
<b>5.8 Teor de Fosfato Após a Permeação</b>	<b>135</b>
<b>5.9 Reologia das Dispersões de Lipossomas Elásticos contendo Cafeína Incorporada</b>	<b>135</b>
<b>6.0 CONCLUSÕES</b>	<b>138</b>
<b>7.0 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>142</b>
<b>8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>143</b>
<b>9.0 ANEXOS</b>	<b>153</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da pele humana.	6
Figura 2 - Três rotas primárias disponíveis para o transporte através do estrato córneo: (a) rota intercelular dentro dos lipídios do estrato córneo; (b) vias transcelulares, que atravessam as células e os lipídios intercelulares do estrato córneo; (c) vias de transporte através dos folículos capilares ou poros da pele.	9
Figura 3 - Modelo de uma vesícula lipídica encapsulando moléculas hidrofóbicas, hidrofílicas e anfifílicas.	11
Figura 4 - L- $\alpha$ -Fosfatidilcolina de ovo, lipídio característico de agregação em bicamada.	12
Figura 5 - Distribuição de ácidos graxos existentes na fosfatidilcolina natural de ovo.	13
Figura 6 - Forma de agregação das moléculas de fosfolipídios que formam as bicamadas.	14
Figura 7 - Organização da bicamada lipídica conforme a temperatura de transição de fases.	15
Figura 8 - Forças de atração entre moléculas na superfície gás-líquido e no interior de um líquido.	17
Figura 9 - Moléculas tensoativas adsorvendo na interface água-ar, formando uma monocamada orientada.	18
Figura 10 - Esquema de uma micela em solução aquosa.	19
Figura 11 - Representação esquemática para o tensoativo PEG-8L.	20
Figura 12 - Esquema ilustrativo do movimento dos lipossomas elásticos atravessando a epiderme com o objetivo de alcançar as camadas mais internas da pele em sentido contrário ao gradiente de hidratação.	22
Figura 13 - Ilustração de um poro de membrana.	24
Figura 14 - Representação de uma vesícula esfero-cilíndrica de comprimento $L^*$ e raio $r$ , movendo-se com velocidade $V$ e separada da parede do poro de raio $R$ por uma camada de lubrificação de espessura $h$ .	28
Figura 15 - Estrutura molecular dos principais alcalóides purínicos.	31
Figura 16 - Modelo esquemático do equipamento para determinação de medidas de tamanho das vesículas por espalhamento de luz.	39
Figura 17 - Aparato experimental para as medidas de tensão superficial pelo método da gota pendente.	41
Figura 18 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas convencionais de lecitina de ovo ( $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) (a) intensidade de luz espalhada (b) número de vesículas.	48
Figura 19 - Micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão de lipossomas convencionais preparados pelo método de Bangham e homogeneizados através de extrusão à média pressão (12 atm) e 20 passagens através de duas membranas sobrepostas de diâmetro de poros 100nm.	51

Figura 20 – Curva para determinação de CMC do PEG-8L livre em solução (■) e do PEG-8L na presença de lipossomas (●).	53
Figura 21 – Perfis de tensão de superfície de monocamada de lecitina de ovo com a injeção de PEG-8L nas concentrações (a) $0,25 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e (b) $0,40 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , correspondentes às proporções molares lecitina:PEG-8L 75:25 e 60:40 respectivamente.	54
Figura 22 – Distribuição de tamanhos após a incorporação do PEG-8L para os lipossomas elásticos, comparativamente à distribuição dos lipossomas convencionais, durante 24 horas. (A, B) 25% de PEG-8L e (C, D) 40% de PEG-8L; c – lipossomas convencionais (antes da incorporação do PEG-8L); e - lipossomas elásticos (após a incorporação do PEG-8L).	56
Figura 23 - Micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão para solução de PEG-8L puro na concentração de $0,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ .	61
Figura 24 - Micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão para as dispersões de lipossomas contendo de 40% de PEG-8L após 1 hora de incubação.	62
Figura 25 – Medidas de tensão superficial durante a incubação dos lipossomas convencionas de lecitina de ovo com PEG-8L nas proporções (a) 25 % (b) 40%.	63
Figura 26 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos das vesículas lipídicas, após permeação em 2,5 atm e $37^{\circ} \text{ C}$ , durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação para os lipossomas convencionais. i – Distribuição para os lipossomas convencionais imediatamente após a permeação de toda a amostra.	65
Figura 27 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos das vesículas lipídicas, após permeação em 5 atm e $37^{\circ} \text{ C}$ , durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação para os lipossomas convencionais.i – Distribuição para os lipossomas imediatamente após a permeação de toda a amostra.	67
Figura 28 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos das vesículas lipídicas, após permeação em 12 atm e $37^{\circ} \text{ C}$ , durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação para os lipossomas convencionais. i – Distribuição para os lipossomas imediatamente após a permeação de toda a amostra.	69
Figura 29 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos das vesículas lipídicas, após permeação em 18 atm e $37^{\circ} \text{ C}$ , durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação para os lipossomas convencionais. i – Distribuição para os lipossomas imediatamente após a permeação de toda a amostra.	71

Figura 30 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos das vesículas lipídicas, após permeação em 20 atm e 37 <sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação para os lipossomas convencionais. i – Distribuição para os lipossomas imediatamente após a permeação de toda a amostra.	73
Figura 31 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos da solução de PEG-8L puro, na concentração de 1.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> , após permeação em 2,5 atm e 37 <sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação para a solução de PEG-8L puro. i – Distribuição para a solução de PEG-8L puro imediatamente após a permeação de toda a amostra.	75
Figura 32 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos da solução de PEG-8-L puro, na concentração de 1.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> , em 5,0 atm e 37 <sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação para a solução de PEG-8L puro. i – Distribuição para a solução de PEG-8L puro imediatamente após a permeação de toda a amostra.	77
Figura 33 – Influência do tempo no diâmetro médio e distribuição de tamanhos da solução de PEG-8-L puro, na concentração de 1.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> , em 12 atm e 37 <sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação para a solução de PEG-8L puro. i – Distribuição para a solução de PEG-8L puro imediatamente após a permeação de toda a amostra.	79
Figura 34 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos da solução de PEG-8-L puro em solução, na concentração de 1.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> , em 18 atm e 37 <sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação para a solução de PEG-8L puro. i – Distribuição para a solução de PEG-8L puro imediatamente após a permeação de toda a amostra.	81
Figura 35 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos da solução de PEG-8-L puro em solução, na concentração de 1.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> , em 20 atm e 37 <sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação para a solução de PEG-8L puro. i – Distribuição para a solução de PEG-8L puro imediatamente após a permeação de toda a amostra.	83
Figura 36 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L), após permeação em 2,5 atm e 37 <sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L). i – Distribuição para os lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.	85
Figura 37 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L), após permeação em 5 atm e 37 <sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L). i – Distribuição para os lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.	88

Figura 38 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L), após permeação em 12 atm e 37 <sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L). i – Distribuição para os lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra	90
Figura 39 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L), após permeação em 18 atm e 37 <sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L). i – Distribuição para os lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.	92
Figura 40 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L), após permeação em 20 atm e 37 <sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L). i – Distribuição para os lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.	94
Figura 41 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L), após permeação em 2,5 atm e 37 <sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L). i – Distribuição para os lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.	96
Figura 42 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L), após permeação em 5 atm e 37 <sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L). i – Distribuição para os lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.	98
Figura 43 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L), após permeação em 12 atm e 37 <sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L). i – Distribuição para os lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.	100
Figura 44 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L), após permeação em 18 atm e 37 <sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L). i – Distribuição para os lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.	102

Figura 45 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L), após permeação em 20 atm e 37° C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L). i – Distribuição para os lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.	104
Figura 46 - Micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão de lipossomas elásticos (40 % de PEG-8L), imediatamente após permeação em duas membranas sobrepostas com poros de 30 nm de diâmetro, na pressão de 2,5 atm.	106
Figura 47 - Micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão de lipossomas elásticos (40 % de PEG-8L), no tempo de 24 h após permeação em duas membranas sobrepostas com poros de 30 nm de diâmetro, na pressão de 2,5 atm.	107
Figura 48 – Influência da pressão de permeação na tensão superficial de lipossomas elásticos preparados a partir de 40 % de PEG-8L.	108
Figura 49 – Curva de permeação de água deionizada em duas membranas de policarbonato sobrepostas, com poros de 30 nm de diâmetro.	113
Figura 50 – Esquema utilizado para estimativa da tortuosidade do sistema de duas membranas sobrepostas. À esquerda, vê-se um quadrado inscrito à circunferência da membrana. O zoom apresentado no canto inferior direito mostra o padrão de formação de quadriculados em relação ao número de poros. Novamente, a ampliação apresentada no canto superior direito mostra o lado de cada quadriculado, formado por dois raios de poro, mais a distância entre eles.	114
Figura 51 – Curvas de permeação de água deionizada, lipossomas convencionais e elásticos em duas membranas de policarbonato sobrepostas, com diâmetro nominal de poros 30 nm.	117
Figura 52 – Permeação das dispersões lipossomais na região de 8 a 18 atm, ajustadas a uma reta. (a) Lipossomas elásticos preparados com 25% de PEG-8L (b) Lipossomas elásticos preparados com 40% de PEG-8L (c) Lipossomas convencionais.	119
Figura 53 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos de cafeína pura em água, com concentração $1.10^{-4}$ mol.L <sup>-1</sup> , após permeação em 2,5 atm e 37° C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação de cafeína pura em água. i – Distribuição para a solução de cafeína pura em água imediatamente após a permeação de toda a amostra.	125
Figura 54 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos de cafeína pura em água, com concentração $1.10^{-4}$ mol.L <sup>-1</sup> , após permeação em 5 atm e 37° C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação de cafeína pura em água. i – Distribuição para a solução de cafeína pura em água imediatamente após a permeação de toda a amostra.	127

Figura 55 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % de PEG-8L) incorporando cafeína, para permeação em 2,5 atm e 37 <sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína. i – Distribuição para lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, imediatamente após a permeação de toda a amostra.	129
Figura 56 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, para permeação em 12 atm e 37 <sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína. i – Distribuição para lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, imediatamente após a permeação de toda a amostra.	131
Figura 57 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, para permeação em 20 atm e 37 <sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas. a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína. i – Distribuição para lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, imediatamente após a permeação de toda a amostra.	133
Figura 58 – Dados de vazão <i>versus</i> queda de pressão para permeação de cafeína pura em água e das dispersões de lipossomas elásticos com 40 % de PEG-8-L incorporando cafeína.	136

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades da cafeína	32
Tabela 2 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas convencionais de lecitina de ovo determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	49
Tabela 3a - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos na proporção 75:25, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) em termos de intensidade de luz espalhada e número de partículas.	57
Tabela 3b - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos na proporção 60:40, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) em termos de intensidade de luz espalhada e número de partículas.	58
Tabela 4 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas convencionais após permeação na pressão de 2,5 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	66
Tabela 5 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas convencionais após permeação na pressão de 5 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	68
Tabela 6 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas convencionais após serem permeados na pressão de 12 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	70
Tabela 7 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas convencionais após serem permeados na pressão de 18 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	72
Tabela 8 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas convencionais após serem permeados na pressão de 20 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	74
Tabela 9 - Distribuições de tamanhos para a solução de PEG-8L puro, após permeação na pressão de 2,5 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	76
Tabela 10 - Distribuições de tamanhos para a solução de PEG-8L puro, após permeação na pressão de 5 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	78
Tabela 11 - Distribuições de tamanhos para a solução de PEG-8L puro, após permeação na pressão de 12 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	80

Tabela 12 - Distribuições de tamanhos para a solução de PEG-8L puro, após permeação na pressão de 18 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	82
Tabela 13 - Distribuições de tamanhos para a solução de PEG-8L puro, após permeação na pressão de 20 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	84
Tabela 14 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) após permeação na pressão de 2,5 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	86
Tabela 15 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) após permeação na pressão de 5 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	89
Tabela 16 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) após permeação na pressão de 12 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	91
Tabela 17 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) após permeação na pressão de 18 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	93
Tabela 18 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) após permeação na pressão de 20 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	95
Tabela 19 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) após permeação na pressão de 2,5 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	97
Tabela 20 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) após permeação na pressão de 5 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	99
Tabela 21 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) após permeação na pressão de 12 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	101
Tabela 22 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) após permeação na pressão de 18 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	103



Tabela 23 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) após permeação na pressão de 20 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	105
Tabela 24 - Valores de tensão superficial obtidos para lipossomas convencionais, PEG-8L, lipossomas elásticos antes e após serem permeados e suas respectivas morfologias.	110
Tabela 25 – Teor de fosfato para os lipossomas convencionais e elásticos (25 e 40 % de PEG-8L), após permeação em duas membranas de policarbonato sobrepostas, com poros de 30 nm de diâmetro, em pressões de 2,5; 12 e 20 atm.	111
Tabela 26 – Parâmetros geométricos da membrana de nanoporos utilizada permeação de água deionizada.	113
Tabela 27 – Valores do coeficiente de permeabilidade de duas membranas de policarbonato sobrepostas, com diâmetro nominal de poro de 30 nm e espessura de 6,0 µm, obtidos da permeação de água deionizada.	116
Tabela 28 – Valores de pressão mínima aplicada ao sistema e tensão de ruptura ou deformação dos lipossomas convencionais e elásticos, respectivamente.	120
Tabela 29 – Valores experimentais de coeficiente de permeabilidade para água e dispersões lipossomais em sistema com duas membranas de policarbonato sobrepostas, com diâmetro de poro de 30 nm e espessura de 6,0 µm.	121
Tabela 30 – Valores de concentração lipossomal, vesículas por unidade de comprimento e comprimento do esfero-cilindro.	123
Tabela 31 – Fatores de redução teóricos e experimentais para o coeficiente de permeabilidade dos lipossomas convencionais e elásticos, com respectivo erro.	123
Tabela 32 – Porcentagem de incorporação de cafeína nas dispersões lipossomais.	124
Tabela 33 - Distribuições de tamanhos da solução de cafeína pura em água, após permeação na pressão de 2,5 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	126
Tabela 34 - Distribuições de tamanhos da solução de cafeína pura em água, após permeação na pressão de 20 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	128
Tabela 35 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, após permeação na pressão de 2,5 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	130
Tabela 36 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, após permeação na pressão de 12 atm e 37 <sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	132

Tabela 37 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, após permeação na pressão de 20 atm e 37 <sup>o</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.	134
Tabela 38 – Teor de fosfolipídio para os lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, após permeação em membranas de policarbonato com poros de 30 nm de diâmetro, em pressões de 2,5; 12 e 20 atm.	135

## **ABREVIATURAS**

CMC: concentração micelar crítica

DSC: calorimetria diferencial de varredura

HEPES: N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanosulfônico]

SUV's: Lipossomas unilamelares pequenos

LUV's: Lipossomas unilamelares grandes

MLV's: lipossomas multilamelares

NMR: ressonância magnética nuclear

PC: fosfatidilcolina

PCS: "photon correlation spectroscopy"

PEGs: tensoativos não iônicos do tipo polietilenoglicol

PEG-8L: polietilenoglicol 8 lauril ester

QLS: espalhamento de luz

SNC: sistema nervoso central

T: temperatura

UF: ultrafiltração

## NOMENCLATURA

A	Área da membrana
$A_e$	Área externa do lipossoma
$A_i$	Área interna do lipossoma
$A_t$	Área da cabeça polar do fosfolipídio
$d_M$	Espessura da membrana
D	Distância do centro do poro
$D_o$	Diâmetro médio do lipossoma
E	Potência
h	Espessura da camada de lubrificação
j	Fluxo volumétrico no poro
J	Fluxo volumétrico na membrana
K	Coeficiente de permeabilidade da membrana
$K_{teo}$	Coeficiente de permeabilidade teórico da membrana
$L^*$	Comprimento da vesícula no poro
n	Número de vesículas por unidade de comprimento
$n_e$	Número de moléculas de fosfolipídio na camada externa do lipossoma
$n_f$	Número de moléculas de fosfolipídio na solução
$n_i$	Número de moléculas de fosfolipídio na camada interna do lipossoma
$n_t$	Número total de fosfolipídios no lipossoma
$n_v$	Número de lipossomas na solução
N	Número de membranas do sistema
$P_{min}$	Pressão mínima
Q	Vazão volumétrica
r	Raio da vesícula no interior do poro
R	Raio do poro da membrana
$R_o$	Raio médio da vesícula
$U_d$	Velocidade de escoamento local
V	Velocidade da vesícula no poro
x	Poros por unidade de área
$\delta$	Espessura da bicamada lipídica
$\Delta E$	Variação de Potência

$\Delta L$	Comprimento percorrido no escoamento
$\Delta P$	Queda de pressão na membrana
$\Delta P^*$	Excedente de queda de pressão na membrana
$\varepsilon$	Porosidade
$\tau$	Tortuosidade
$\gamma$	Tensão de lise ou ruptura do lipossoma
$\mu$	Viscosidade do fluido

## RESUMO

Neste trabalho, lipossomas compostos de lecitina de ovo comercial e do tensoativo octaoxietilenoglicol-8-lauril éster (PEG-8L) foram preparados, caracterizados e estudados quanto aos aspectos de incorporação do PEG-8L, sua transição de formas, elasticidade e reologia em membranas de nanoporos. Lipossomas convencionais (sem o PEG-8L) foram usados como controle. A cafeína concentrada, extraída de sementes de guaraná, foi incorporada com eficiência de 11,0%; 41,9% e 39,9%, para os lipossomas convencionais e elásticos com 25% e 40% de PEG-8L, respectivamente. A cinética de incorporação do PEG-8L nos lipossomas, sua reologia e transição de formas foram caracterizadas através de medidas de diâmetro médio, distribuição de tamanhos, teor de fosfato, morfologia, e tensão superficial das dispersões. A reologia foi estudada em membranas de nanoporos, sintéticas e constituída de pele de orelha de porco dermatomizada. O diâmetro médio e distribuição de tamanhos foram monitorados ao longo de 24 horas para avaliação da estabilidade dos lipossomas. Os resultados mostraram a incorporação de PEG-8L, quantificada em 20,4% e 15,4% para as proporções molares iniciais lipídio: PEG-8L 75:25 e 60:40 respectivamente. A reologia de lipossomas elásticos através de membranas de nanoporos apresentou comportamento linear entre vazão e queda de pressão, na faixa de 10 a 18 atm, com permeabilidade efetiva dependente da concentração e deformação dos lipossomas. Um modelo reológico de membrana para lipossomas convencionais foi modificado para contemplar o escoamento de lipossomas elásticos e discutida a sua aplicação. A tensão superficial, deformação e imagens dos lipossomas contendo 40% de PEG-8L após a permeação, sugerem que a elasticidade e manutenção da sua integridade são devidos à compactação das cadeias de PEG-8L na sua superfície. Esses resultados contribuem para o entendimento dos mecanismos de permeação de lipossomas através da pele e para o desenvolvimento de formulações lipossomais para o transporte transdérmico de bioativos.

**PALAVRAS-CHAVE:** lipossomas elásticos; PEG-8L, transporte transdérmico.

## ABSTRACT

In this work, liposomes prepared with commercial egg lecithin and octaoxyethylenelaurate-ester (PEG-8L) were characterized and studied in respect to PEG-8L incorporation, shape transitions, elasticity and rheology in nanopores membranes. Conventional liposomes (without PEG-8L) were used as control. The concentrated caffeine, extracted of guarana seeds, was incorporated with efficiency of 11,0%, 41,9% e 39,9%, for conventional and elastic liposomes with 25% and 40% of PEG-8L, respectively. The kinetic of PEG-8L incorporation in liposomes, its rheology and shape transitions were characterized through average diameter measurements, sizes distribution, phosphate concentration and surface tension of dispersions. The rheology was studied in synthetic nanoporous membranes and dermatomized ear pig skin. Average diameter and distribution were monitored during 24 hours for evaluation of liposomes stability. The results show PEG-8L incorporation in 20,4% and 15,4% for initial molar ratios lipid:PEG-8L 75:25 and 60:40. The rheology of elastic liposome across nanoporous membranes shows linear behavior between flow and pressure drop, in the range of 2,5 to 20 atm, with effect permeability dependent of liposome concentration and deformation. The rheological model of membranes for conventional liposomes was modified to contemplate the elastic liposome flow and to discuss its application. The surface tension, deformation and electron micrographs of elastic liposome with 40% of PEG-8L after permeation, suggested that the elasticity and its integrity maintenance were due to PEG-8L chains packing at its surface. This results contribute for knowledge of liposomes permeation mechanisms across skin and development of liposome formulation for drug transdermal transport.

**KEYWORDS:** elastic liposomes; PEG-8L, transdermal transport.

## 1.0 INTRODUÇÃO

---

Nas últimas décadas, a via transdérmica tem sido considerada a mais inovadora e promissora para a administração e liberação sustentada de bioativos, principalmente por ser uma via não invasiva (Cecv e Blume, 2001).

A liberação sustentada de compostos bioativos na pele tem sido explorada nas aplicações de produtos cosméticos e farmacêuticos. Nos últimos tempos, é evidente o aumento da preocupação de mulheres e homens com a aparência, que começa com maiores cuidados com a pele, seja no intuito de corrigir imperfeições, ou na tentativa de prevenir e/ou retardar o aparecimento de sinais de envelhecimento. Nesse contexto, atualmente o mercado de produtos cosméticos tem crescido expressivamente, representando valores da ordem de milhões de dólares anuais (Magdassi, 1997).

Tanto a indústria cosmética como a farmacêutica são capazes de projetar sistemas de veiculação via transdérmica. A diferença é que a indústria farmacêutica inclui formulações projetadas com a finalidade de veicular o ativo até a circulação geral, e a cosmética auxilia somente a introdução do ativo nas barreiras da pele (Cecv *et al.*, 1996).

As principais vantagens da administração de ativos pela via transdérmica em relação às demais são a redução da sua metabolização quando comparada ao trato gastrointestinal e fígado, e o conforto do paciente na aplicação. Apesar dos benefícios citados, a penetração de compostos através da pele é limitada devido à sua baixa permeabilidade. Para contornar essa dificuldade, têm-se empregado várias estratégias físicas e químicas, dentre elas a utilização de lipossomas elásticos que representam a mais recente formulação para o transporte transdérmico de moléculas bioativas. Os lipossomas elásticos são capazes de penetrar em maior profundidade nas camadas da pele e se manterem íntegros, devido à sua alta permeabilidade e capacidade de deformação (Bouwstra *et al.*, 2003).



Lipossomas são reconhecidos por terem habilidade facilitadora na permeação de compostos através da pele (Kim *et. al*, 2002), e pesquisas progressivas nesta área têm possibilitado o desenvolvimento de produtos cada vez mais avançados na área de cosméticos (Daniels, 2001).

Os lipossomas ou vesículas de fosfolipídios são partículas coloidais cujos fosfolipídios que se agregam em bicamadas, são capazes de incorporar compostos hidrofílicos, hidrofóbicos ou anfifílicos na sua matriz. Pela sua composição e configuração, os lipossomas mimetizam as células vivas, são biocompatíveis e possuem maior capacidade de interação com as células, quando comparados com outras partículas usadas na veiculação de compostos bioativos. Nas aplicações tópicas, os lipossomas são capazes de interagir com os lipídios da pele humana, liberando os compostos veiculados na sua estrutura. Além disso, em formulações cosméticas, os lipossomas propiciam o suprimento dos lipídios perdidos da pele e reduzem a perda transepidermal de água (Cevc e Blume, 2001).

A principal barreira para permeação de substâncias ativas na pele é o estrato córneo, região que apresenta uma estrutura estratificada de queratinócitos, revestidos de lipídios organizados em camadas lamelares. Dessa organização, resultam poros muito pequenos entre as células, da ordem de 30 nm, os quais dificultam a difusão das moléculas bioativas. Nessa estrutura, inclui-se também a presença dos folículos pilosos, cuja dimensão dos seus poros é de 50 nm (Leonardi, 2004).

Alternativas convencionais para contornar essas propriedades da barreira da pele incluem a utilização de agentes específicos chamados promotores de absorção, que provocam alterações na estrutura do estrato córneo, diminuindo sua resistência natural à permeação de compostos bioativos (Idson, 1975). Dentre os promotores de absorção, encontra-se os tensoativos, que interagindo com os lipídios da pele facilitam o transporte intercelular, ou seja, através dos poros da pele. Os lipossomas convencionais também são considerados promotores de absorção (Cevc *et al.*, 1996).

Os lipossomas elásticos constituem o mais novo conceito de vesículas que diferem dos lipossomas convencionais com relação à fluidez e elasticidade da membrana. Por este motivo são capazes de atravessar barreiras semipermeáveis mantendo a sua integridade sendo, portanto, mais eficientes que os convencionais para aplicações de fármacos e cosméticos que necessitam de maior penetração na pele (Cevc *et al.*, 2002). A característica de elasticidade desses lipossomas é produzida na presença de fosfolipídios de baixa temperatura de transição de fases, que se encontram no estado líquido-cristalino à temperatura ambiente (25°C), juntamente com compostos cuja função é aumentar a fluidez da bicamada lipídica e permitir a sua deformação, sem ruptura.

As pesquisas sobre lipossomas elásticos ainda são escassas e os principais trabalhos reportados na literatura são praticamente de dois grupos de pesquisadores: Gregor Cevc, do Departamento de Medicina Biofísica da Universidade Técnica de Munique, na Alemanha, e Joke A. Bouwstra, da Divisão de Tecnologia Farmacêutica e Centro de Ciências Biofarmacêuticas da Universidade de Leiden, na Holanda. Cevc (1991) patenteou uma formulação de lipossomas ultra-deformáveis, registrada como “Transfersomes<sup>TM</sup>” (Innovative Dermal Applications ‘IDEA’, Munich, Germany), capazes de passarem intactos e carrearem bioativos através da pele. Nestas formulações, o colato de sódio foi usado como tensoativo para produzir elasticidade nos transfersomas para o transporte transdérmico (Cevc 1991, 1995 a; Cevc *et al.*, 1995 b, 1997; Cevc e Blum, 2001; Cevc e Schätzlein, 2002; Cevc e Gebauer, 2003). A utilização de tensoativos poliméricos não iônicos de cadeia simples para aumentar a fluidez da bicamada lipídica e permitir maior penetração dos lipossomas na pele, foi introduzida por Bouwstra *et al.* (1999, 2003) e Van den Bergh *et al.* (1998, 1999, 2001), com os ésteres de sacarose derivados dos ácidos esteárico e palmítico, uma mistura de mono, di e tri-ésteres derivado do ácido láurico ou o éster de polioxietileno também derivado do ácido láurico e polioxietilenoglicol-8-lauril éster (PEG-8L). A primeira abordagem de lipossomas elásticos foi feita por Cevc (1992, 1993 e 1996), incorporando colato de sódio. Posteriormente, Van den Bergh *et al.* (1999) introduziram vesículas rígidas e elásticas constituídas somente dos

surfactantes: sucrose laurato éster (L-595) e PEG-8L. Para ambos os autores, a elasticidade das vesículas baseia-se no mesmo princípio, sendo resultado da combinação de moléculas estabilizantes e desestabilizantes dentro da bicamada. Outro grupo que se destaca nessa área tem sido coordenado pela Bouwstra, utilizando PEG-8L associado a estabilizantes. Esse grupo estudou a caracterização das vesículas elásticas formadas por surfactante não iônico, quanto à estrutura, tamanho e estabilidade (Hofland *et al.*, 1988; Van Hal *et al.*, 1996; Bouwstra *et al.*, 1997; van den Bergh *et al.*, 2001). A interação dessas vesículas elásticas com a pele (Hofland *et al.*, 1991; van den Bergh *et al.*, 1999, Honeywell-Nguyen *et al.*, 2002 a; Bouwstra *et al.*, 2002; Honeywell-Nguyen *et al.*, 2003 a) e sua utilização para liberação transdérmica também foram estudados (Honeywell-Nguyen *et al.*, 2002 b; 2002 c, 2003 b, 2004, 2006; Honeywell-Nguyen e Bouwstra, 2003).

Neste trabalho, estudou-se a incorporação do PEG-8L em lipossomas convencionais, para a formação dos lipossomas elásticos e a sua transição de formas, elasticidade e reologia em membranas de nanoporos (30nm). Lipossomas convencionais (sem o PEG-8L) foram usados como controle. A cafeína concentrada, extraída de sementes de guaraná, foi encapsulada para avaliar os seus efeitos nas características reológicas e de elasticidade dos lipossomas.

A cinética de incorporação do PEG-8L nos lipossomas, sua reologia e transição de formas foram caracterizadas através de medidas de diâmetro médio, distribuição de tamanhos, teor de fosfato, morfologia, e tensão superficial das dispersões. A reologia foi estudada em membranas de nanoporos, sintéticas e constituída de pele de orelha de porco dermatomizada, na faixa de pressões de 2,5 a 20 atm. O diâmetro médio foi monitorado ao longo de 24 horas após a permeação para avaliação da estabilidade dos lipossomas.

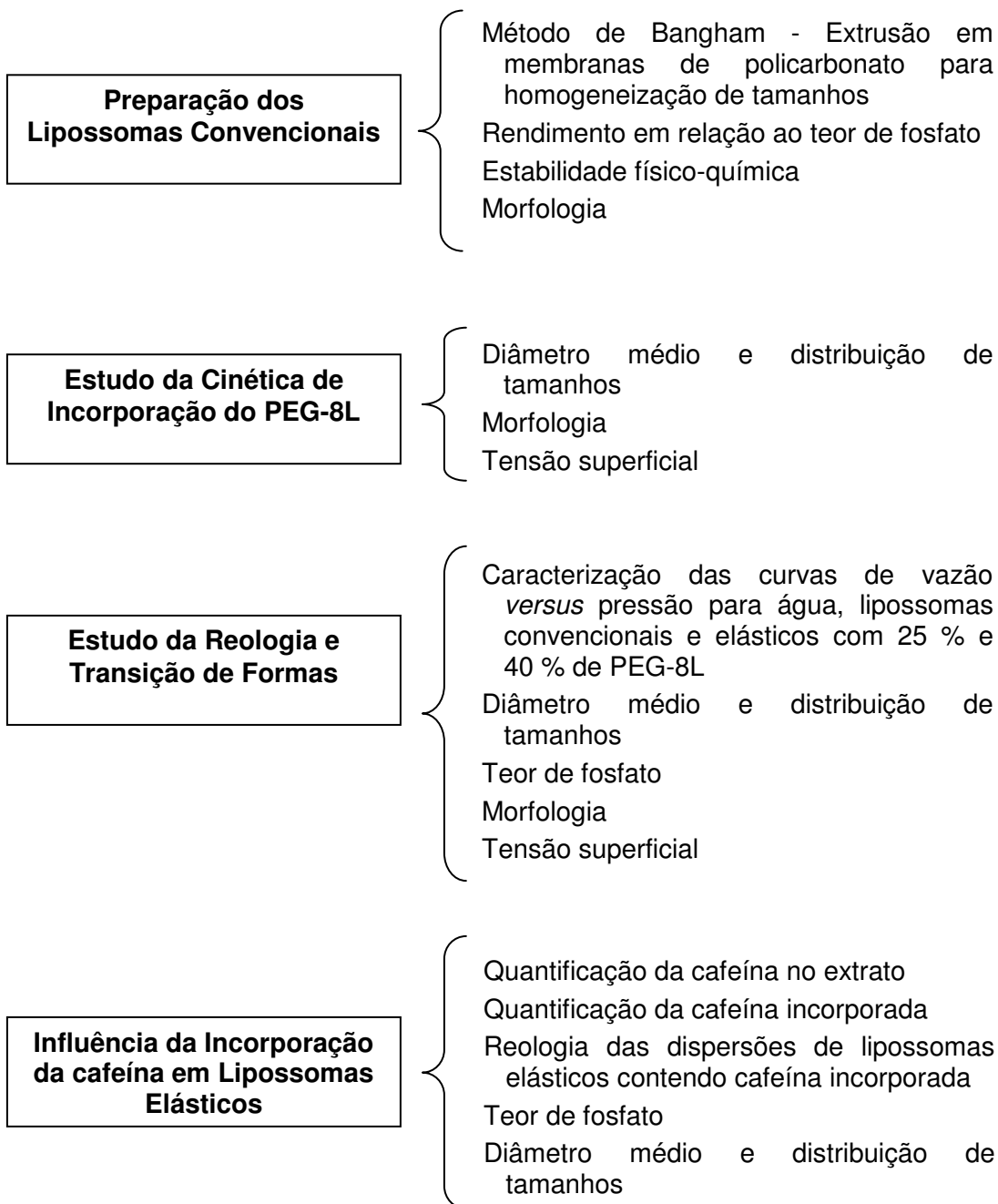
Os resultados obtidos mostram que os lipossomas são capazes de mudar de forma durante a passagem através das membranas e sugerem um mecanismo para a preservação da sua integridade por meio da modificação da sua superfície com PEG-8L.

## 2.0 OBJETIVO

---

O objetivo deste trabalho foi estudar a incorporação de PEG-8L em lipossomas, sua transição de formas, elasticidade e reologia em membranas de nanoporos.

Esse objetivo foi atingido através das seguintes etapas:



### 3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

#### 3.1 Estrutura da Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, ocupando área média de  $2\text{m}^2$ , o que corresponde de 10 a 15% do peso total corporal (Leonardi, 2004). No corpo humano, a pele é o principal alvo de agressões exógenas e sua principal função é a proteção contra fatores climáticos nocivos, como frio e vento, radiações ultravioletas e perda de água endógena. Sua estrutura é composta por três camadas: Epiderme (camada superior), Derme (camada intermediária) e Hipoderme (camada profunda), (Wells *et al.*, 2004). Descrições mais simples consideram a pele composta somente de duas camadas, epiderme e derme (Cevc *et al.*, 1996).

A Figura 1 mostra um modelo esquemático da pele e das suas camadas.

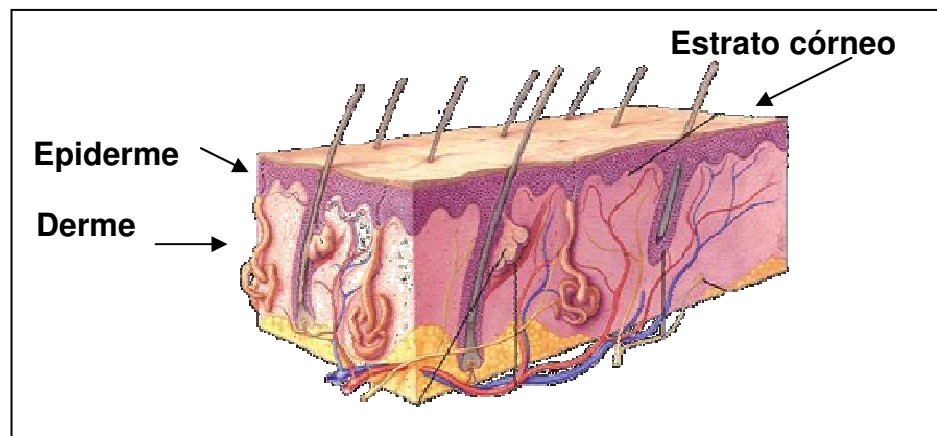


Figura 1 - Representação esquemática da pele humana.

A epiderme é a região mais externa da pele e está em contato permanente com o ambiente. Sua camada superior, o estrato córneo, impede a entrada de substâncias nocivas, evitando a evaporação excessiva de água que levaria à desidratação exercendo, desse modo, a função de barreira (Wells *et al.*, 2004). Apesar de sua pequena espessura (1-10% do total), a epiderme contribui cerca de

80% para a resistência ao transporte transdérmico, sendo o estrato córneo o principal responsável por essa barreira de permeabilidade (Cevc *et al.*, 1996).

O estrato córneo possui um importante papel na resistência da pele a agressões mecânicas, sendo esta resistência dependente de suas propriedades hidrofílicas e lipofílicas (Wissing e Muller, 2003). Assim, um aumento na hidratação e nutrição da pele melhora sua resistência contra deformações.

Evidências também demonstram que o colesterol e lipídios de cadeias longas saturadas, como ácidos graxos livres e ceramidas, predominam no estrato córneo e, juntos, são capazes de diminuir a permeabilidade dessa camada (Golden *et al.*, 1987, Marjukka Suhonen *et al.*, 1999, Bouwstra *et al.* 2003).

Além disso, devido suas cadeias alifáticas longas e sua baixa polaridade, os lipídios intercelulares são firmemente empacotados e aparecem como lipídios multilamelares. Em muitos locais, estes lipídios aderem fortemente às membranas dos corneócitos, o que contribui para a rigidez e impermeabilidade da pele intacta (Cevc *et al.*, 1996).

A derme, região mais interna da pele, é 10 a 20 vezes mais espessa que a epiderme e mecanicamente estabilizada por uma rede entrelaçada de fibras de colágeno. Consiste no local chefe da distribuição assim como o maior local de degradação bioquímica e biológica do material transportado. A derme, além disso, protege o sangue e capilares da linfa, terminações nervosas, glândulas, folículos capilares dentre outros (Cevc *et al.*, 1996).

Bouwstra *et al.* (1999) sugeriram que interações vesícula-pele são influenciadas por características químicas das vesículas como sua composição e carga, e características físicas como o estado físico, lamelaridade e tamanho. As vesículas interagem com o estrato córneo por três principais mecanismos (Bouwstra *et al.*, 1999): 1) penetração de vesículas intactas no estrato córneo onde as vesículas ou se localizam ou passam para a derme; 2) Adsorção ou fusão de vesículas na superfície da pele; 3) penetração dos constituintes da vesícula na pele, o que pode afetar a estrutura das regiões intercelulares do estrato córneo.

A penetração das vesículas através da pele pode ser comparada ao comportamento de parasitas, tais como helmintos, durante a sua invasão no corpo hospedeiro. Inicialmente o parasita cria uma passagem na pele e penetra através das suas barreiras com o consumo de energia metabólica sendo, finalmente, distribuído pelo corpo. Os transferssomas, que não possuem fontes internas de energia, atingem a mesma meta, explorando gradientes de energia que ocorrem naturalmente na pele. A diferença na quantidade de água nas diferentes camadas da pele é, provavelmente, o gradiente natural mais importante. Ajustes na elasticidade, diâmetro e distribuição de tamanhos das vesículas, minimizam os gastos de energia para a penetração na pele intacta (Paul *et al.*, 1998, Cevc *et al.*; 1995, 1997 e 1998).

Para o desenvolvimento de estudos de permeação cutânea têm-se empregado pele de suínos, visto que a espessura da camada córnea dos suínos é semelhante à da pele humana. Como a camada córnea é considerada a principal barreira à permeação, justifica-se a escolha deste animal como modelo experimental. Além disso, a pele de suínos apresenta menor quantidade de pêlos, quando comparada à pele de outros animais; fator também limitante à permeação cutânea (Leonardi, 2004).

### **3.2 Transporte Transdérmico**

Nas últimas décadas, a via transdérmica tem sido considerada a mais inovadora e promissora para administração e liberação sustentada de bioativos (Cecv e Blume, 2001). Dentre as principais vantagens dessa via em relação às demais incluem-se redução da sua metabolização quando comparada ao trato gastrointestinal e fígado, redução dos efeitos colaterais e, conseqüentemente, maior conforto do paciente na aplicação e potencial para liberação contínua (Prausnitz, 1997).

Segundo Prausnitz (1997), existem três vias para o transporte de moléculas através da pele (Figura 2). A primeira envolve a rota intercelular tortuosa dos lipídios do estrato córneo, normalmente indisponível para a maioria

das moléculas por ser energeticamente desfavorável e extremamente lenta (Figura 2a). Outra rota é a via transcelular que atravessa as células e os lipídios intercelulares do estrato córneo, ou seja, as moléculas não são transportadas através das bicamadas multilamelares e sim ao longo delas (Figura 2b). A terceira rota evita as bicamadas lipídicas intercelulares, seguindo um caminho dentro dos poros e folículos capilares (Figura 2c).

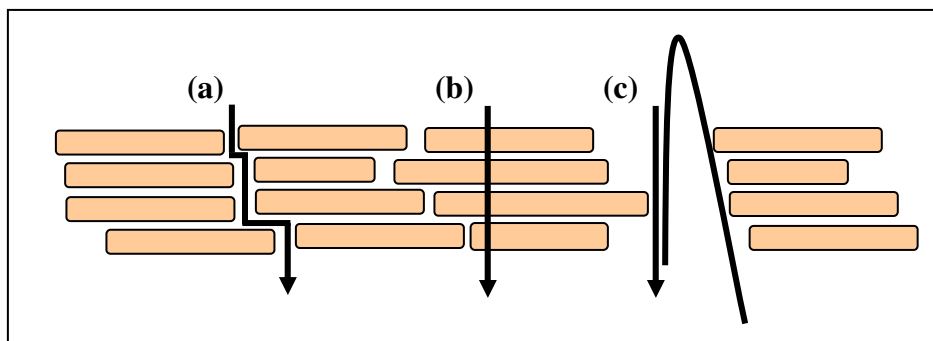


Figura 2 - Três rotas primárias disponíveis para o transporte através do estrato córneo: (a) rota intercelular dentro dos lipídios do estrato córneo; (b) vias transcelulares, que atravessam as células e os lipídios intercelulares do estrato córneo; (c) vias de transporte através dos folículos capilares ou poros da pele. Adaptada de Prausnitz (1997)

Devido à limitação do transporte de compostos através da pele, estudos para aumentar a liberação transdérmica têm sido desenvolvidos enfocando a alteração da estrutura da bicamada lipídica para aumentar a permeabilidade. Dentre as estratégias físicas e químicas desenvolvidas para modificar as propriedades de barreira da pele destacam-se (Prausnitz, 1997):

- Agentes químicos que alteram o ambiente lipídico da pele, aumentando a solubilidade do bioativo na pele e/ou aumentando a difusividade do bioativo na pele;
- Iontoforese, que utiliza a aplicação de um campo elétrico através da pele para melhorar o transporte transdérmico;



- Sonoforese, que utiliza ultrassom para criar novas vias transdérmicas por cavitação;
- Eletroporação, que por meio de curtos pulsos de alta voltagem, cria novas vias transdérmicas pela alteração da estrutura da bicamada lipídica;
- Lipossomas, que são vesículas lipídicas que encapsulam bioativos e que facilitam o transporte transdérmico.

Devido sua biocompatibilidade e capacidade de incorporar fármacos hidrofílicos e lipofílicos, os lipossomas têm sido cada vez mais estudados como sistemas para liberação transdérmica de bioativos (Schreier e Bouwstra, 1994).

### **3.3 Lipossomas**

Lipossomas são agregados de fosfolipídios em estrutura de bicamada, contendo um volume aquoso central circundado por uma ou várias lamelas concêntricas formando partículas unilamelares ou multilamelares, com diâmetros da ordem de nanômetros a dezenas de micra. Nesse processo de formação, os lipossomas encapsulam parte do meio aquoso em que se encontram dispersos. De acordo com seu tamanho, morfologia e características físico-químicas, estas estruturas possuem capacidade de encapsulação de compostos hidrofílicos no seu núcleo aquoso e compostos hidrofóbicos nas bicamadas lipídicas e oferecem larga aplicação em diversas áreas (Mertins *et al.*, 2004). A bicamada formada comporta-se como uma membrana semipermeável com relação ao material encapsulado no volume aquoso das vesículas (Lasic, 1993; Crommelin e Schreier, 1994). A Figura 3 mostra esquematicamente a estrutura dos lipossomas e a encapsulação de compostos na estrutura lipossomal.

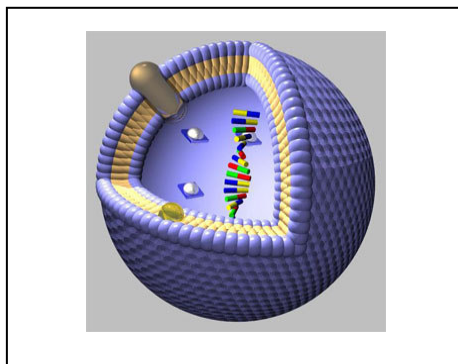


Figura 3 - Modelo de uma vesícula lipídica encapsulando moléculas hidrofóbicas, hidrofílicas e anfifílicas. Extraído do site (<http://www.avantilipids.com>, 2004).

Os fosfolípidios são os principais componentes estruturais dos lipossomas. São moléculas de caráter anfifílico, na qual uma cabeça polar, que neste caso é um grupo fosfato, está ligada a duas cadeias de hidrocarbonetos através de uma molécula de glicerol.

A formação dos lipossomas foi caracterizada pelo pesquisador inglês Alec Bangham (Bangham *et al.*, 1965) que demonstrou em seus experimentos que fosfolípidios suspensos em excesso de solução aquosa são capazes de formar bicamadas lipídicas concêntricas e multilamelares, da ordem de nanômetros ou micrômetros, semelhantes a pequenas células ou vesículas. Inicialmente, estas vesículas esféricas foram usadas como modelos de bicamadas lipídicas para estudar o transporte de íons através das membranas celulares, servindo de base para uma série de estudos posteriores em biofísica de membranas (Cevc, 1993).

Na medicina, a pesquisa de lipossomas como vetores de liberação controlada de fármacos e agentes bioativos tem aumentado significativamente. Este fato se deve, principalmente, às suas propriedades, tais como: biodegradabilidade, estabilidade e fácil interação com as células, proporcionando uma maior performance da substância ativa na pele.

Os fosfolipídios mais usados são do grupo das fosfatidilcolinas, ou lecitinas, as quais pertencem ao grupo dos glicerofosfolipídios. As lecitinas são bastante empregadas por serem o principal lipídeo estrutural tanto em membranas biológicas quanto biomédicas e um outro fator muito importante deve-se ao baixo custo comparado com outros fosfolipídios.

Os lipossomas podem ser preparados a partir de fosfolipídios naturais ou sintéticos. Enquanto as lecitinas de origem sintética possuem uma composição de cadeias de hidrocarbonetos muito bem definidas, as de origem natural são compostas de misturas de fosfolipídios com diferentes cadeias tanto em tamanho quanto em grau de insaturação. As lecitinas de origem natural podem ser extraídas tanto de fontes animais, como a gema de ovo, quanto vegetais, como os grãos de soja.

A L- $\alpha$ -Fosfatidilcolina de ovo (PC) é composta por uma mistura de fosfolipídios com ácidos graxos variados, de cadeias saturadas de 16:0 (34%) e 18:0 (11%) e insaturadas de 16:1 (2%), 18:1 (32%), 18:2 (18%), 20:4 (3%) (<http://www.avantilipids.com>, 2004). A Figura 4 apresenta a estrutura química deste lipídio.

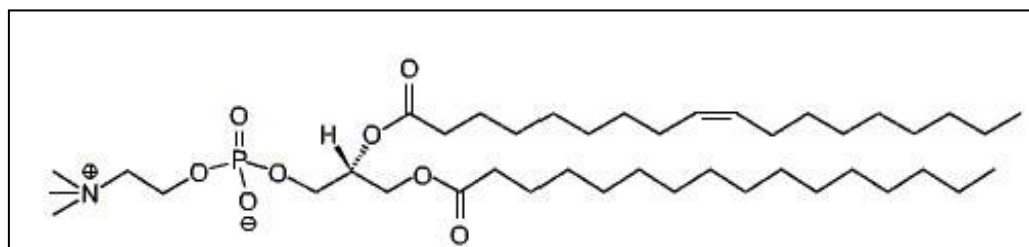


Figura 4 - L- $\alpha$ -Fosfatidilcolina de ovo, lipídio característico de agregação em bicamada.

A Figura 5 apresenta graficamente a distribuição de ácidos graxos presentes na fosfatidilcolina natural de ovo, mostrando que as maiores proporções referem-se ao ácido graxo saturado com 16 átomos de carbono (16:0) e monoinsaturado com 18 átomos de carbono (18:1).

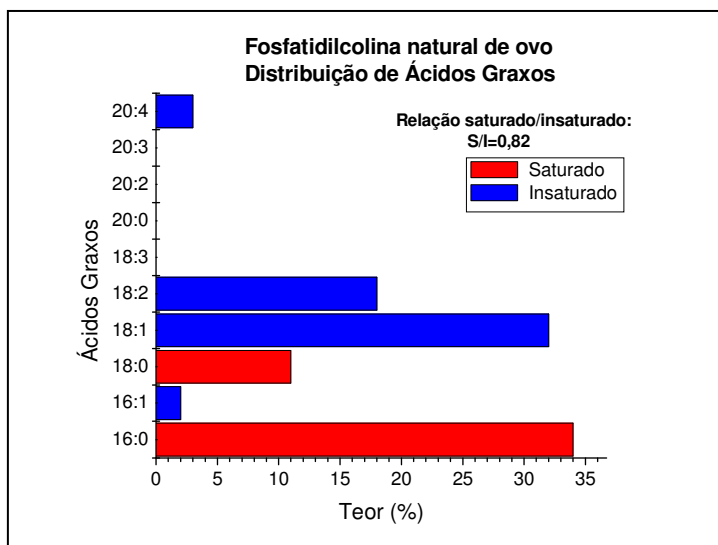


Figura 5 - Distribuição de ácidos graxos existentes na fosfatidilcolina natural de ovo (<http://www.avantilipids.com>, 2004).

### 3.3.1 Classificação e propriedades dos lipossomas

Os lipossomas podem diferir quanto ao tamanho, organização estrutural e composição lipídica. A classificação mais encontrada na literatura é em relação ao tamanho e ao número de lamelas. O tamanho pode variar de 20 nanômetros a 60 micrômetros, enquanto que para a organização estrutural, as vesículas podem ser classificadas como multilamelares (MLV's), unilamelares pequenas (SUV's) e unilamelares grandes (LUV's) (Lasic, 1993) com diâmetros até 100nm e entre 100 e 500nm, respectivamente. Uma justificativa para esta definição de (LUV's) e (SUV's) é baseada no espectro de ressonância magnética nuclear (NMR). (SUV's). Em geral, fornecem espectros com boa resolução, ao passo que (LUV's) fornecem espectros de baixa resolução, devido ao tombamento lento das vesículas em suspensão (Cevc, 1993). A distribuição de tamanhos depende dos métodos de preparação e homogeneização de tamanhos.

A Figura 6 mostra a forma de agregação das moléculas de fosfolipídios, que em meio aquoso organizam-se na forma de bicamadas, expondo as suas cabeças hidrofílicas à água e interagindo as caudas hidrofóbicas de modo a

excluir a água, formando assim estruturas lamelares que, para atingirem estabilidade termodinâmica, curvam-se e fecham-se sobre si mesmas formando vesículas esféricas. Estas são capazes de permear substâncias encapsuladas.

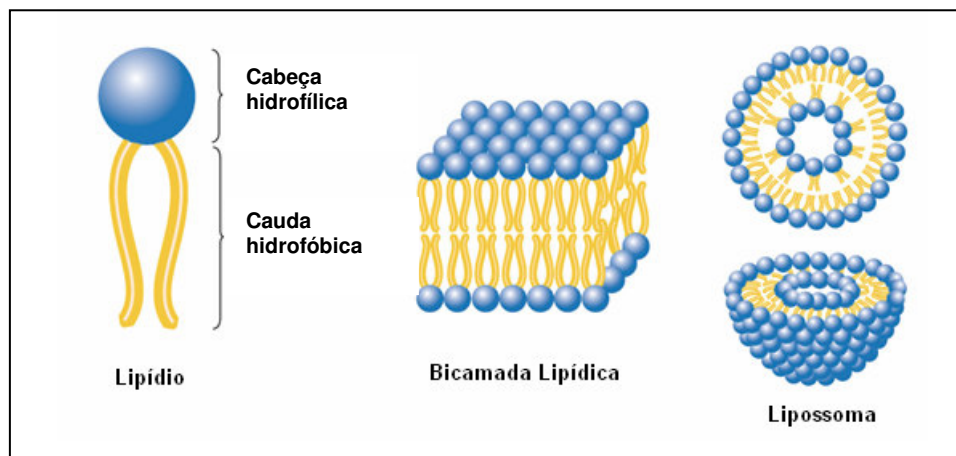


Figura 6 - Forma de agregação das moléculas de fosfolipídios que formam as bicamadas.

Neste processo de formação, os lipossomas podem encapsular no seu interior substâncias, como: peptídeos e proteínas, hormônios, enzimas, antibióticos, agentes antifúngicos, agentes anti-câncer, DNA e vírus (Lasic, 1993; Farrell e Sirkar, 1997).

Outro componente lipídico presente em lipossomas é o colesterol que influencia significativamente as propriedades estruturais das vesículas, como a fluidez da bicamada e ainda pode conferir maior estabilidade às mesmas, dependendo da sua concentração, acima da temperatura de transição de fases (New, 1990).

A bicamada lipídica formada, capaz de acomodar moléculas hidrofóbicas encapsuladas, comporta-se como uma membrana semipermeável com relação ao material hidrofílico encapsulado no seu volume aquoso (Lasic, 1993; Crommelin e Scherrieier, 1994).

Para atravessar as barreiras da pele, os carreadores devem possuir diâmetros em torno de 30nm ou menos. Os lipossomas convencionais, formados

somente por fosfolipídios, atuam como reservatórios de compostos que vão sendo difundidos a uma taxa controlada, ou localizam-se nas camadas mais superficiais da pele onde são desestabilizados por não conseguirem penetrar de forma eficaz. Mesmo os lipossomas unilamelares pequenos são raramente menores que 50nm ao menos que eles sejam comprimidos e/ou suplementados com tensoativo ou produtos de deformação.

Para o desenvolvimento de formulações cosméticas mais eficazes e estáveis, é preciso que o carreador atravesse os poros da pele e seja permeado desde a camada mais superficial até as camadas mais profundas. A evolução da tecnologia tem favorecido o estudo desta técnica nos últimos anos, visando o desenvolvimento de produtos mais eficientes no mercado.

Os lipossomas convencionais, formados unicamente por fosfolipídios são estruturas organizadas, que abaixo da temperatura de transição de fases formam um empacotamento bastante rígido, denominado de fase gel. Assim, quando submetidos à permeação, os lipossomas se rompem e a aplicação do ativo se limita aos espaços intercelulares da epiderme. Com estudos realizados por Bouwstra *et al.*, 2003, pode-se dizer que os lipossomas estariam no estado gel, ou seja, numa forma rígida, e para que sejam permeados, precisam estar mais fluidizados, no estado líquido-cristalino, onde as membranas estão mais fluidas, conforme mostra a Figura 7.

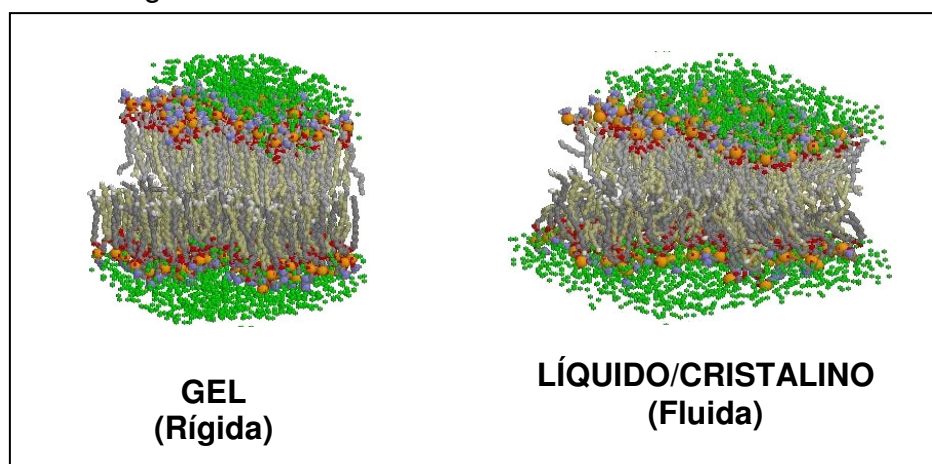


Figura 7 - Organização da bicamada lipídica conforme a temperatura de transição de fases.

Além disso, variação em outras características físicas das vesículas, assim como tamanho, número de bicamadas e carga também podem influir na taxa de penetração (Bouwstra *et al.*, 2003).

Se uma bicamada lipídica formada por apenas um componente, em excesso de água, sofre aquecimento sob condições de pressão controlada, ocorrerão múltiplas transições termotrópicas que podem ser detectadas, por exemplo, por calorimetria diferencial de varredura (DSC). Destas transições de fases, a única que é reproduzível por esta técnica ao longo de repetidos aquecimentos é a transição principal, denominada temperatura de transição de gel para líquido-cristalino ( $T_m$ ). Durante esta transição, grandes mudanças entrópicas ocorrem. Quando a indução para a transição de fases ocorre abruptamente, observam-se várias mudanças estruturais da molécula lipídica que ocorrem em um pequeno intervalo de temperatura. A alteração mais importante que ocorre é a mudança conformacional da cadeia acila que envolve a isomerização rotacional *trans-gauche* dos grupos metileno das ligações simples carbono-carbono. Com isso, o volume molar da molécula torna-se maior quando  $T > T_m$ , ocorrendo ao mesmo tempo a diminuição da espessura da bicamada e um aumento da distância entre as cadeias laterais (Huang e Li, 1999).

Assim, pode-se dizer que o desenvolvimento de novos sistemas de liberação transdérmica de bioativos foi influenciado principalmente pelo estudo de novos tensoativos sintéticos uma vez que estes interferem no empacotamento da bicamada lipídica, tornando-as mais flexíveis, e com propriedades elásticas (Nacht, 1995; Magdassi, 1997).

### **3.4 Tensão Superficial**

A existência de uma tensão presente em uma interface líquida foi observada há muito tempo. Acreditava-se que existisse uma espécie de película na superfície dos líquidos. Essa tensão superficial é a responsável pela forma esférica de pequenas gotas de água ou pelo fato de uma aranha andar sobre a superfície da água e não afundar, por exemplo.

A tensão superficial corresponde à energia livre da superfície, isto é, está relacionada a uma variação de energia livre do sistema, mantido a uma temperatura, pressão e composição constantes, quando o mesmo é submetido a uma variação em sua área. Tensão superficial também é definida como o trabalho necessário para aumentar a superfície em uma unidade de área. Ocorre nas interfaces entre dois fluidos (gás-líquido ou líquido-líquido) ou entre um fluido e um sólido (gás-sólido ou sólido-líquido) (Florence e Attwood, 2003).

A tensão superficial está estritamente ligada às interações interatômicas ou intermoleculares. Partindo-se do interior do líquido para a fase de vapor, passando pela interface líquido vapor, tem-se uma variação contínua na densidade. Uma molécula ou átomo presente na interface está, em média, circundado por um número menor de vizinhos quando comparado com outra no interior da fase líquida, devido a maior densidade desta última. Assim, haverá uma força líquida atraindo as moléculas da interface em direção ao interior do líquido como mostrada na Figura 8.

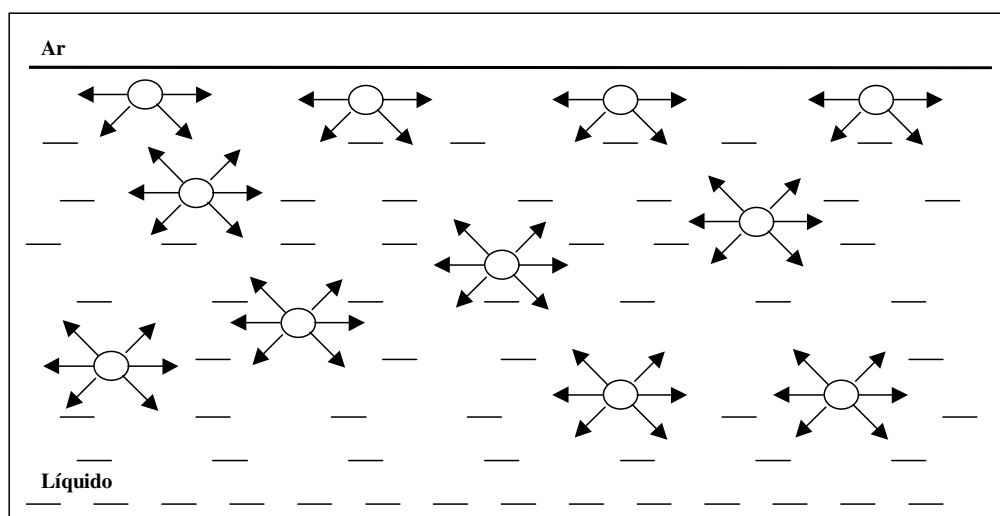


Figura 8 - Forças de atração entre moléculas na superfície gás-líquido e no interior de um líquido.

A associação da tensão superficial às ligações intermoleculares, explica porque o mercúrio, cujos átomos interagem principalmente, através de ligações metálicas (ligações fortes), apresenta uma tensão superficial da ordem de



485  $\text{mN.m}^{-1}$ \*, enquanto que a água, cujas moléculas atraem-se principalmente por ligações de hidrogênio, tem uma tensão superficial de 72,75  $\text{mN.m}^{-1}$ \*, e o n-octano, cujas interações são provenientes de dipolos induzidos ou forças de Van der Waals, apresenta uma tensão superficial de 21,8  $\text{mN/m}^*$ .

\*Valores de tensões superficiais a 20°C .

### 3.5 Tensoativos

Substâncias tensoativas são aquelas que têm a capacidade de se adsorver fortemente em superfícies de líquidos ou na superfície de separação entre dois líquidos imiscíveis, formando camadas moleculares orientadas (processo conhecido por atividade superficial).

Estas substâncias são estruturalmente providas de um grupo polar – hidrofílico - e de uma parte apolar – hidrofóbica - na mesma molécula sendo estas também conhecidas por moléculas anfifílicas. A parte polar dos tensoativos pode ser carregada negativamente (tensoativos aniônicos), positivamente (catiônicos) ou não serem carregadas eletricamente (não-iônicos), conforme Figura 9.

Em uma interface água-ar, estas moléculas orientam-se de maneira a manter a parte hidrofílica em contato com a água, e a parte hidrofóbica dirigida ao ar, formando uma camada monomolecular de moléculas na interface que se encontram em equilíbrio com as moléculas presentes no interior da solução.

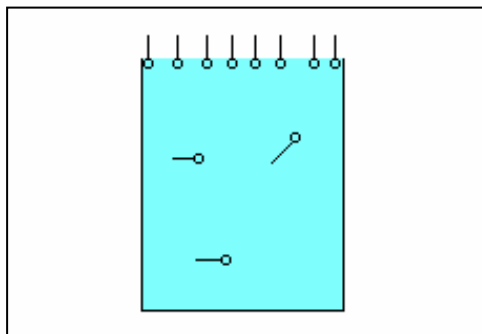


Figura 9 - Moléculas tensoativas adsorvendo na interface água-ar, formando uma monocamada orientada.

Com o aumento da concentração de tensoativo no interior da solução, pode ocorrer a formação de agregados desse tensoativo, denominados micelas (Figura 10), que ocorre para diminuir a energia livre do sistema.

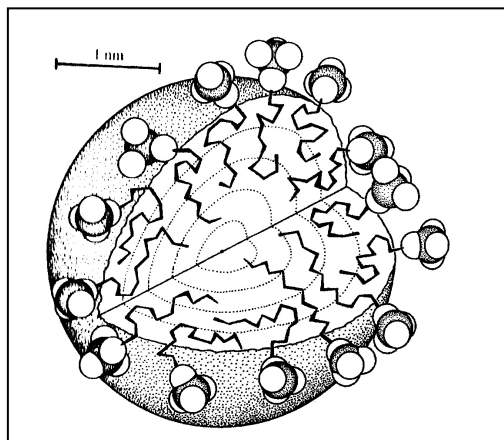


Figura 10 - Esquema de uma micela em solução aquosa (Israelachvili, 1991).

A concentração acima da qual se pode verificar a ocorrência destas micelas é denominada concentração micelar crítica (CMC). Em solução aquosa (polar), estes agregados estão dispostos de forma que sua cadeia lipofílica se oriente para o interior da micela e o grupo hidrofílico esteja em contato com a solução.

A partir da CMC, a tensão superficial permanece aproximadamente constante, visto que o potencial químico do tensoativo não se altera significativamente após a formação de micelas.

No entanto, se dispusermos de uma molécula anfifílica insolúvel, os fenômenos acima descritos não ocorrem; uma vez que não existe um equilíbrio entre as moléculas da solução e da superfície, pelo fato de que estas permanecem apenas na interface.

Dentre os tensoativos estudados, o polioxietilenoglicol-8-lauril (PEG-8L) apresentou resultados satisfatórios quanto à flexibilidade dos lipossomas. O PEG-8L é um tensoativo não iônico de cadeia simples (Van den Berg *et al.*, 1999).

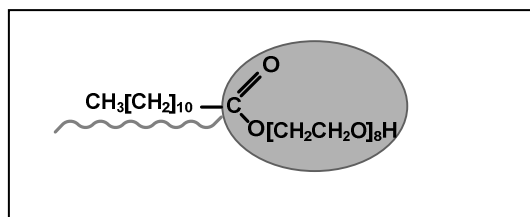


Figura 11 - Representação esquemática para o tensoativo PEG-8L.

### 3.5.1 Incorporação de tensoativos em lipossomas

O conhecimento do processo físico-químico envolvido na interação entre lipossomas e tensoativos é de grande interesse uma vez que fornece informações úteis para um bom entendimento do fenômeno complexo de interação entre a pele humana e tensoativos. Além disso, com a crescente utilização de lipossomas como sistema de liberação em formulações tópicas, é importante o conhecimento de possíveis incompatibilidades que podem ocorrer quando lipossomas-tensoativo estão incluídos nas formulações cosméticas (Ribosa *et al.*, 1992).

De acordo com Fadda *et al.* (1998), quando concentrações crescentes de tensoativos são adicionadas a uma suspensão de lipossomas um processo de três estágios pode ser considerado:

- *Estágio inicial:* Quando a concentração de tensoativo se encontra abaixo de sua concentração micelar crítica (CMC), as moléculas de tensoativo estão distribuídas entre a solução e as bicamadas fosfolipídicas. Essas bicamadas podem acomodar algumas moléculas de tensoativo sem serem rompidas, embora possam ocorrer mudanças em suas propriedades físicas. Quando a concentração de tensoativo aumenta, atinge-se uma concentração máxima na qual ocorre a saturação da bicamada pelas moléculas de tensoativo. O valor dessa concentração depende da natureza da bicamada e do tensoativo empregado.

- *Estágio final:* Este estágio se inicia quando somente micelas mistas lipossomas-tensoativo estão presentes. Com a subsequente adição de tensoativo, as micelas tornam-se menores e mais diluídas em fosfolipídios.

- *Estágio intermediário:* Os fosfolipídios são gradualmente solubilizados havendo a co-existência de lipossomas e micelas mistas.

Estes diferentes estágios podem ser facilmente seguidos por medidas de espalhamento de luz e/ou turbidez e concentração de tensoativos (Ribosa *et al.*, 1992), microscopia eletrônica de transmissão e tensão superficial.

Uma das formas de quantificar a porcentagem de tensoativo incorporada nos lipossomas convencionais para formação dos lipossomas elásticos, é a utilização da técnica da monocamada de Langmuir. A técnica de Langmuir é baseada no espalhamento de uma substância anfifílica na interface ar-água, sendo que essa substância deve apresentar as características de ser insolúvel, e apresentar um coeficiente de espalhamento favorável à ocorrência desse processo, ou seja, deve se orientar nesta interface de forma a minimizar sua energia livre (Langmuir, 1917). Além disso, a técnica permite não apenas análise de interações entre a substância formadora da monocamada, mas também com outras, que se encontrem na subfase. Dessa forma, é possível verificar a interação de substâncias solúveis em meio aquoso, eletrólitos, polímeros, peptídeos e proteínas, o que torna o método um excelente modelo mimetizador de membranas biológicas, quando a monocamada for constituída por um lipídeo, ou por misturas destes (Brockman, 1999; Brezesinski e Möhwald, 2003).

Quando uma substância anfifílica adsorve na interface água-ar, provoca uma diminuição na tensão superficial da água, até um novo valor de tensão. Essa variação da tensão superficial é chamada de pressão superficial, propriedade que fornecerá informações a respeito da adsorção da monocamada formada. Para membranas biológicas, a pressão superficial é de 30 a 35 mN.m<sup>-1</sup> (Li *et al.*, 2001).

Nesta técnica, a presença de uma barreira móvel, capaz de varrer a superfície, faz com que a monocamada possa ser comprimida ou expandida. Sendo a tensão superficial medida por uma placa de Wilhelmy, e com a compactação dessa monocamada, um aumento na pressão superficial será observado com a compressão da mesma.

### 3.6 Lipossomas Elásticos

Os lipossomas elásticos são formados por lipossomas convencionais, compostos de fosfolipídios, e tensoativos que aumentam a elasticidade das lamelas produzindo vesículas capazes de sofrer deformações sem serem desestruturadas. Esses lipossomas são adequados para administração transdérmica de bioativos e podem penetrar em camadas mais profundas da pele. Estudos *in vitro* da penetração transdérmica têm demonstrado as suas propriedades elásticas (Cevc *et al*, 2002).

A Figura 12 representa esquematicamente a deformação dos lipossomas elásticos ao atravessar poros muito menores que seu diâmetro sem se romper.

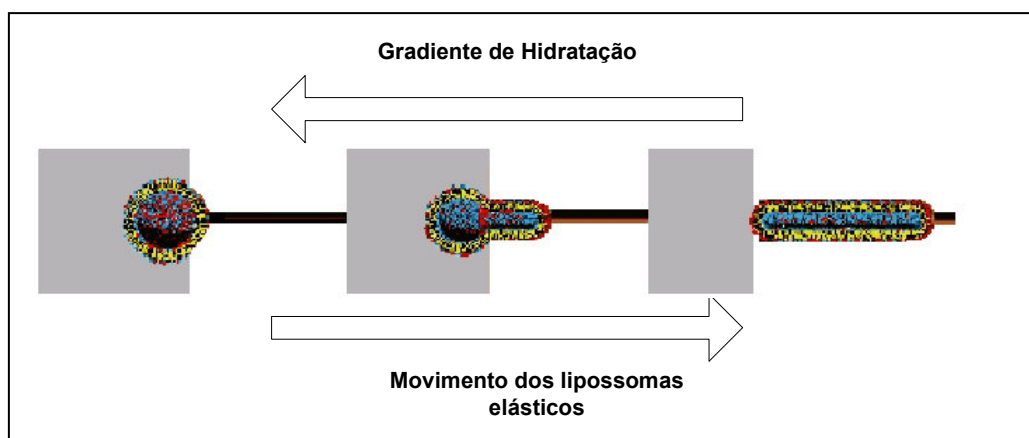


Figura 12 - Esquema ilustrativo do movimento dos lipossomas elásticos atravessando a epiderme com o objetivo de alcançar as camadas mais internas da pele em sentido contrário ao gradiente de hidratação (University of Rochester, 2005).

Com base em considerações físico-químicas, Cevc (1992) desenvolveu vesículas elásticas para melhorar o transporte de droga pelo estrato córneo para a epiderme viável. A penetração de vesículas intactas no estrato córneo em tecidos adjacentes é possível sob certas condições como em aplicações não oclusivas de vesículas elásticas.

A força de hidratação que governa a penetração destas vesículas elásticas para a pele é maior que a resistência quando elas passam nas regiões

lipídicas intercelulares do estrato córneo. Essa força é gerada por um amplo gradiente de hidratação através da pele, variando de 15 a 20% no estrato córneo a 70% no estrato granuloso (Van den Berg *et al.*, 1999).

Combinando tensoativos que formam bicamadas com tensoativos de cadeia simples que formam micelas, vesículas podem ser desenvolvidas com elasticidades variadas dependendo da razão molar dos componentes. A elasticidade nos lipossomas foi produzida pela associação de fosfolipídios estruturais de baixa temperatura de transição de fases, como a lecitina de ovo com o tensoativo PEG-8L, como componente elástico.

A presença simultânea em uma membrana de diferentes moléculas tanto estáveis quanto não estáveis e sua tendência a se redistribuir na bicamada é o que torna essas vesículas mais elásticas comparadas aos lipossomas convencionais (Van den Berg *et al.*, 1999).

### **3.7 Escoamento de Fluidos em Meios Porosos**

A Lei de Darcy foi desenvolvida em 1856 pelo engenheiro hidráulico francês Henry Darcy (1803-1858) ao conduzir seu famoso experimento de escoamento de água através de meios porosos. Essa lei considera a linearidade entre a vazão e a queda de pressão, e a constante de proporcionalidade representa a permeabilidade do meio, que só depende das suas propriedades físicas. Posteriormente, essa lei foi estendida para representar o escoamento da grande parte de fluidos em meios porosos, incluindo membranas (Slattery, 1972).

O modelo clássico de permeação em membranas é apresentado na série BIOTOL (1992), dentre outros livros. Assume-se no equacionamento que a membrana possui poros paralelos de mesmo diâmetro, de geometria cilíndrica, como mostra a Figura 13. Também é considerada que a permeação do fluido pela fase sólida da membrana é desprezível quando comparada à permeação pelos poros da membrana.

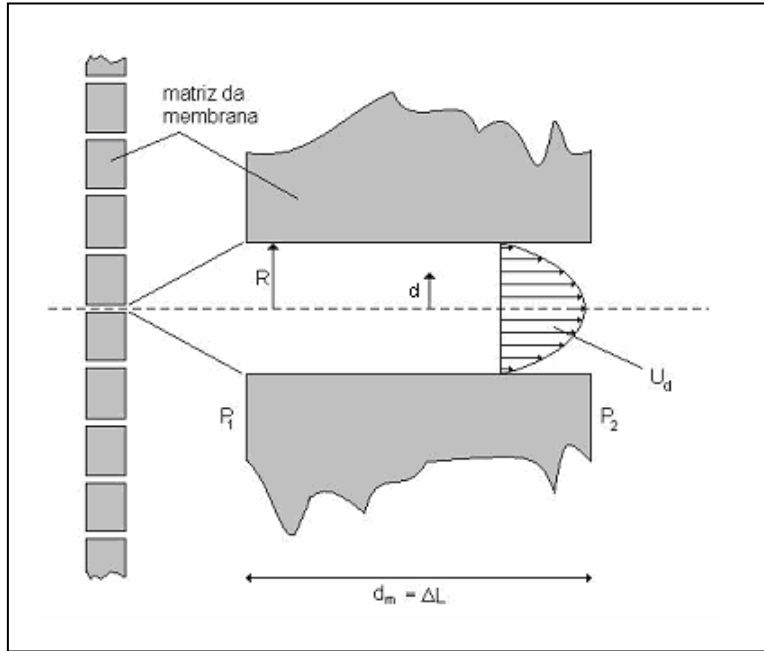


Figura 13 - Ilustração de um poro de membrana (Adaptado de BIOTOL, 1992).

A velocidade do escoamento no poro pode ser descrito pela Lei de Poisseulle (Equação 1),

$$U_r = -\frac{R^2}{8\mu} \frac{\Delta P}{\Delta L} \left( 1 - \left( \frac{r}{R} \right)^2 \right) \quad (\text{Eq. 1})$$

sendo  $U_r$  a velocidade de escoamento local,  $R$  o raio do poro,  $\Delta P$  a queda de pressão através da membrana,  $\Delta L$  o comprimento percorrido no escoamento,  $r$  a distância do centro do poro e  $\mu$  a viscosidade do fluido.

O fluxo  $j$  através de um único poro pode ser obtido através de integração da Equação 1 ao longo do raio do poro ( $r = 0 \rightarrow R$ ) e do ângulo ( $\theta = 0 \rightarrow 2\pi$ ), o que conduz à Equação 2:

$$j = \frac{\pi R^4}{8\mu} \frac{\Delta P}{\Delta L} \quad (\text{Eq. 2})$$

Definindo a porosidade ( $\varepsilon$ ) da membrana como a relação entre a área de espaços vazios e a área total da membrana, como mostra a Equação 3:

$$\varepsilon = \frac{\pi R^2 x}{A} \quad (\text{Eq. 3})$$

e assumindo que existam  $x$  poros por unidade de área  $A$ , o fluxo através da membrana, por unidade de área será:

$$J = \frac{jx}{A} \quad (\text{Eq. 4})$$

Inserindo as Equações 2 e 3 na Equação 4, chegamos à Equação 5:

$$J = \frac{\varepsilon R^2}{8\mu} \frac{\Delta P}{\Delta L} \quad (\text{Eq. 5})$$

No caso onde o caminho efetivo percorrido pela solução não se restringe à espessura da membrana, o seu tamanho pode ser aproximado por  $N\tau d_m$ , em que  $N$  é o número de membranas do sistema,  $d_m$  é a espessura da membrana e  $\tau$  é denominado tortuosidade. Para um sistema com uma única membrana, se  $\tau = 1$  então  $\Delta L = d_m$ , e a Equação 5 se torna:

$$J = \frac{\varepsilon R^2}{8\mu} \frac{\Delta P}{N\tau d_m} \quad (\text{Eq. 6})$$

Definindo o coeficiente de permeabilidade  $K$  como:

$$K = \frac{\varepsilon R^2}{8Nd_m\tau} \quad (\text{Eq. 7})$$

a equação 6 se reduz a:

$$J = K \frac{\Delta P}{\mu} \quad (\text{Eq. 8})$$



A Equação 7 mostra que a permeabilidade do sistema é uma constante que depende unicamente da geometria da membrana e do número de membranas. Já o fluxo (Equação 8) é proporcional tanto à pressão transmembrana quanto à permeabilidade, e inversamente proporcional à viscosidade do fluido. A última equação pode ser rearranjada, visto que o fluxo  $J$  é a razão entre a vazão  $Q$  e a área de permeação  $A$  (Equação 9).

$$Q = \frac{K A}{\mu} \Delta P \quad (\text{Eq. 9})$$

### 3.8 Escoamento de Lipossomas Através de Membranas

Numa visão de engenharia, a pele humana foi simulada por uma membrana com raio de poro igual ao tamanho de poro do estrato córneo (30 nm), e a permeação de lipossomas foi analisada utilizando-se o desenvolvimento matemático utilizado para a permeação de meios porosos.

A Lei de Darcy prevê que não existe vazão de solução na ausência de uma diferença de pressão transmembrana. Hunter e Frisken (1998) apontam que, tratando-se de dispersões coloidais, como as de lipossomas, pode não existir vazão mesmo com pressão aplicada ao sistema. Esses estudos foram realizados com lipossomas convencionais de lipídios sintéticos com diferentes temperaturas de transição de fases, voltados para a extrusão de lipossomas a pressões de 0 a 20 atm, aproximadamente, visando os ciclos repetitivos de ruptura das vesículas e reestruturação, para a homogeneização de tamanhos. Nesse contexto, os referidos autores estabeleceram que o início da permeação está limitado a uma pressão inicial mínima ( $P_{\min}$ ), necessária à deformação da vesícula ao atravessar um poro menor que seu diâmetro. Esta pressão inicial permite calcular a tensão de lise ou ruptura dos lipossomas ( $\gamma$ ), através da Equação 10.

$$P_{\min} = 2\gamma \left[ \frac{1}{R} - \frac{1}{R_o} \right] \quad (\text{Eq. 10})$$

em que R é o raio do poro e  $R_o$  é o raio médio da vesícula.

Paralelamente, os estudos teóricos realizados por Bruinsma (1996) sugerem a inserção de um termo na Equação de Darcy que leve em conta a dissipação de energia pelo atrito entre a camada externa da vesícula e a parede do poro, na forma de um excedente de queda de pressão  $\Delta P^*$ , que é requerido para transportar do fluido através da membrana (Equação 11),

$$J = \frac{K}{\mu} (\Delta P - n\Delta P^* N \tau d_m) \quad (\text{Eq. 11})$$

em que n é o número de vesículas por unidade de comprimento.

Seja uma vesícula de raio inicial  $R_o$  maior que o raio do poro R da membrana e área superficial constante, no interior do poro, esta vesícula esférica assume a forma de um esfero-cilindro de comprimento  $L^*$ , calculado a partir da igualdade das áreas em suas diferentes formas (Equação 13) e raio r (Figura 14):

$$4\pi R_o^2 = 4\pi r^2 + 2\pi r L^* \quad (\text{Eq. 12})$$

$$L^* = 2 \frac{(R_o^2 - r^2)}{r} \quad (\text{Eq. 13})$$

O raio da vesícula no interior da membrana é igual ao raio do poro, menos a espessura da camada de lubrificação h (Equação 14)

$$r = R - h \quad (\text{Eq. 14})$$

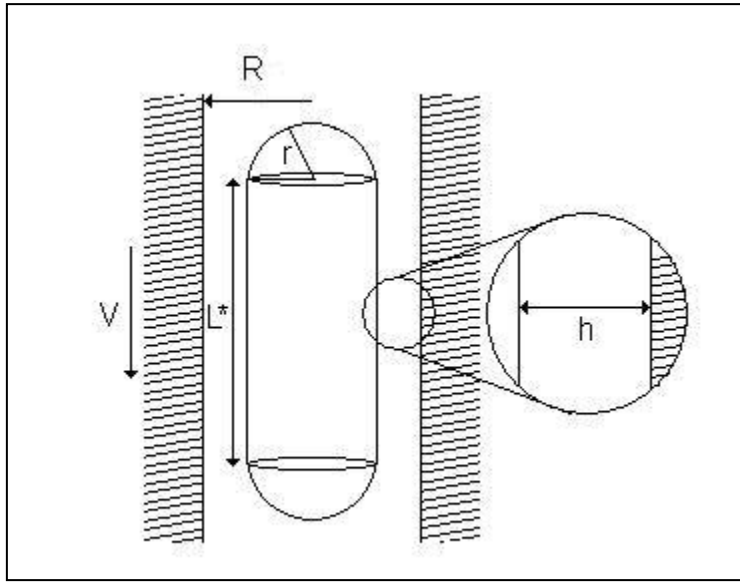


Figura 14 - Representação de uma vesícula esfero-cilíndrica de comprimento  $L^*$  e raio  $r$ , movendo-se com velocidade  $V$  e separada da parede do poro de raio  $R$  por uma camada de lubrificação de espessura  $h$  (Adaptado de Hunter e Frisken, 1998).

É a camada de lubrificação que permite o movimento da vesícula, separando-a da parede do poro, e sua espessura é uma função da velocidade  $V$  do fluido. A utilização de métodos numéricos permite calculá-la a partir da Equação 15:

$$h \cong 2,05R \left( \frac{\eta V}{\gamma} \right)^{\frac{2}{3}} \quad (\text{Eq. 15})$$

O número adimensional  $\eta V/\gamma$  é conhecido como Número Capilar e relaciona as forças viscosas aplicadas à vesícula e as forças de tensão superficial.

A energia dissipada por segundo, ou potência, na camada de lubrificação de uma vesícula pode ser aproximada por:

$$E \cong \eta \left( \frac{V}{h} \right)^2 2\pi R h L^* \quad (\text{Eq. 16})$$

e a variação de potência fornecida pela queda de pressão  $\Delta P^*$  ao longo da vesícula é igual a

$$\Delta E = \pi R^2 \Delta P^* V \quad (\text{Eq. 17})$$

Igualando-se a potência dissipada (Equação 16) e a potência aplicada ao sistema (Equação 17), obtém-se a Equação 18:

$$\eta \frac{VL^*}{h} = \frac{R\Delta P^*}{2} \quad (\text{Eq. 18})$$

A espessura da camada de lubrificação  $h$ , estimada a partir da Equação 15 pode ser inserida na Equação 18, e excedente de queda de pressão na membrana  $\Delta P^*$  isolado e substituído na Equação 11, resultando na Lei de Darcy modificada à presença de vesículas na dispersão, utilizada a pressões elevadas, com a redução do coeficiente de permeabilidade (Equação 19):

$$J = \frac{K}{\left( 1 + 0,0291(nL^*) \left( \frac{L^*}{R} \right)^2 \right)} \frac{\Delta P}{\mu} \quad (\text{Eq. 19})$$

A Equação 19 mostra que a permeabilidade do sistema é reduzida por um fator  $1/(1 + 0,0291(nL^*)(L^*/R)^2)$  devido à presença de vesículas na dispersão. O valor do fator de redução não é o mesmo que o observado no trabalho de Bruinsma (1996) pois foi feito um rearranjo das variáveis, mantendo-se entretanto a validade do modelo.

Este conceito pode ser finalmente combinado ao de pressão mínima proposto por Hunter e Frisken (1998). Sabendo-se que o fluxo J é a razão entre a vazão Q e a área de permeação A, temos a Equação 20, que modela a vazão de dispersões de vesículas em membranas.

$$Q = \frac{K}{\left(1 + 0,0291(nL^*)\left(\frac{L^*}{R}\right)^2\right)^\mu} \frac{A}{\mu} (\Delta P - P_{\min}) \quad (\text{Eq. 20})$$

### 3.9 Cafeína

A cafeína é um alcalóide farmacologicamente ativo, pertencente ao grupo das xantinas. É inodora e possui sabor amargo bastante característico.

Segundo Pelletier (1997), os alcalóides são as moléculas cíclicas que contêm pelo menos um átomo de nitrogênio e que são verdadeiros metabólitos secundários. Os alcalóides formam um grupo muito vasto de metabólitos que podem ocorrer tanto em microorganismos como plantas superiores e inferiores e ainda em animais, apesar de nestes últimos ocorrerem com rara frequência. Entre os alcalóides que possuem propriedades estimulantes, encontram-se as metilxantinas, ou alcalóides purínicos.

Dentre os alcalóides purínicos (Figura 15) mais importantes estão os derivados metilados de xantinas, destacando-se a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), a teofilina (1,3-dimetilxantina) e a teobromina (3,7-dimetilxantina). Dentre as principais fontes de cafeína destacam-se sementes de guaraná *Paullinia cupana* (3-6% de cafeína), folhas de chá mate *Ilex paraguariensis* (2% de cafeína) e sementes de café (1-2% de cafeína).

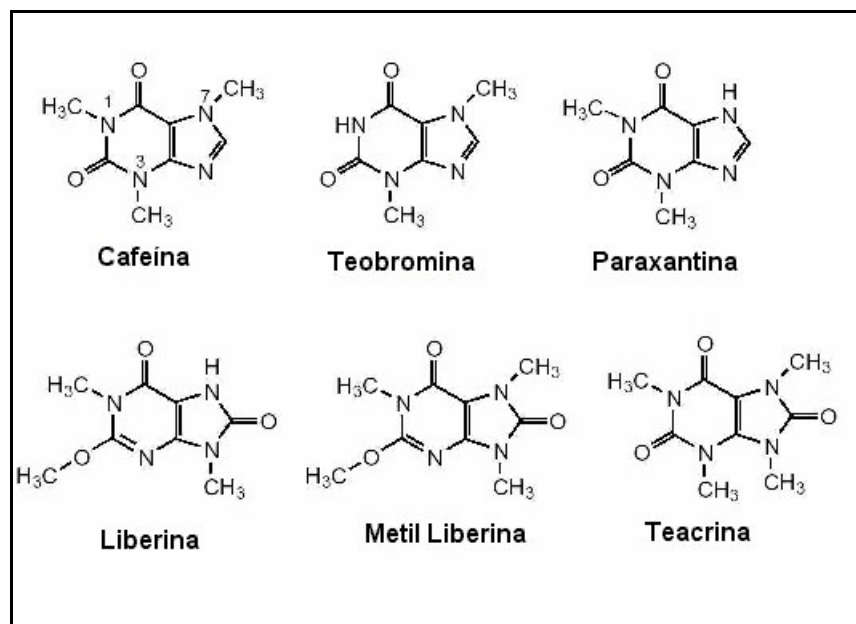


Figura 15 - Estrutura molecular dos principais alcalóides purínicos (Ashihara e Crozier, 2001).

As propriedades da cafeína, alcalóide de interesse deste trabalho, estão apresentadas na Tabela 1.

A cafeína é conhecida também como guaranina, trimetildioxipurina, 1,3,7 trimetilxantina ou metilobromina (Schereck, 1975).

Em temperatura ambiente, a cafeína apresenta-se sob forma de cristais acidulares longos, flexíveis, inodoros, incolores e de sabor amargo. O cristal de cafeína cristaliza-se a partir de soluções aquosas, desidratando lentamente em temperatura ambiente.

Tabela 1: Propriedades da cafeína (Martin *et al.*, 1981; Li e Hartland, 1992; Johannsen e Brunner, 1994)

Propriedade	
Fórmula molecular	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
Massa molecular (g g mol <sup>-1</sup> )	194,19
Ponto de ebulição (K)	628,2
Densidade (g cm <sup>-3</sup> ) (C.N.T.P)	1,321-1,333
Parâmetro de solubilidade a 298 K (cal cm <sup>-3</sup> ) <sup>0,5</sup>	13,8
Espectro de absorção UV em água ( $\lambda_{\text{máx.}}$ ) (nm)	273-280
Ponto de sublimação (K)	451
Ponto de fusão (K)	508-511
Solubilidade ideal (fração molar) (em água) 298 K	0,0289

Muitos autores estudaram os efeitos fisiológicos do consumo de cafeína. Podem-se citar os trabalhos de Hughes (1994) e Evans e Griffiths (1999) que estudaram respectivamente a síndrome da abstinência causada pela cafeína. Libermann *et al.* (1987) estudaram os efeitos de pequenas doses de cafeína na performance humana. Griffiths e Woodson (1988) e Strain *et al.* (1994) relataram os sintomas da dependência de cafeína, dentre vários outros estudos.

A cafeína também é usada na formulação de cosméticos, principalmente para tratamento da celulite. Outras aplicações incluem o enrijecimento do busto por fortalecer os tecidos conectivos e estimular o crescimento de novas células (Ernest *et. al.*, 2001).

Os mecanismos de ação da cafeína no corpo humano são similares aos das anfetaminas e cocaína, agindo nos mesmos receptores do sistema nervoso central (SNC). Entretanto, seus efeitos são mais fracos do que o destas drogas. A ligação da adenosina, um neurotransmissor natural, aos seus receptores diminui a atividade neural e dilata os vasos sanguíneos, entre outros efeitos. A cafeína liga-

se a estes receptores impedindo a ação da adenosina sobre o SNC, o que estimula a atividade neural e causa a constrição dos vasos sanguíneos. Muitos medicamentos contra dor de cabeça, como Aspirina Forte<sup>®</sup>- Bayer, Melhoral<sup>®</sup>- Sydney Ross, Doril<sup>®</sup>- Dorsay e Neosaldina<sup>®</sup>- Abbott, contêm cafeína em suas formulações. Com o aumento da atividade neural devido à ingestão do alcalóide, a glândula pituitária libera grandes quantidades de adrenalina, causando uma série de efeitos no corpo humano, como taquicardia, aumento da pressão arterial, abertura dos tubos respiratórios, aumento do metabolismo e contração dos músculos.

Muitos métodos são utilizados para obtenção de alcalóides (como a cafeína) a partir de produtos naturais. Em sua grande maioria utilizam solventes orgânicos imiscíveis em água, em geral prejudiciais ao meio ambiente e ao ser humano, para a extração dos alcalóides. Outras técnicas alternativas utilizam solventes solúveis em água (álcoois), menos seletivos, para o processo de extração. As etapas posteriores de purificação destes dois tipos de processos, para que o produto final esteja livre de contaminantes e possua um rendimento satisfatório, são dispendiosas e demoradas. Outro problema que estes métodos apresentam é a degradação térmica devido às temperaturas alcançadas nos processos de extração e purificação (McKillop, 1970).

Atualmente a extração em fluido supercrítico, assim como neste trabalho para a extração de cafeína de sementes de guaraná em grãos torradas, adquiridas pela EMBRAPA da Amazônia, tem sido usada para extração de vários produtos naturais, pois elimina o uso de solventes orgânicos e preserva a integridade das moléculas (Kopcak, 2003).



## 4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1 Materiais

Os lipossomas convencionais foram preparados utilizando-se os materiais descritos a seguir:

Lipídio: Fosfatidilcolina de ovo (Ovothin 160), 60,8% de fosfatidilcolina (Degussa), MM 760 g/mol;

Solventes: Clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), MM 119,38g/mol (Merck) e metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), MM 32,04g/mol (Merck);

Tampão: N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanossulfônico] (HEPES), MM 238,00 g/mol (Sigma);

A homogeneização de tamanhos foi feita por extrusão utilizando-se extrusora de aço inox modelo T.001 da Lipex Biomembranes Inc., com capacidade para um volume de 10mL, com camisa térmica para circulação de água aquecida a uma temperatura acima da transição de fases dos lipídios.

Para aplicação de pressão no processo de extrusão utilizou-se a extrusora acoplada a um cilindro de nitrogênio.

Para as análises quantitativas dos fosfolipídios foram usados os reagentes:

- Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), MM 98,8g/mol, 95% (Synth),
- Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), MM 34,01g/mol, 30% PA (Merck),
- Ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ), MM 176,12g/mol, 99% (Aldrich),
- Molibdato de amônio ( $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), MM 1235,9 g/mol 81,2% (Sigma).

A preparação dos lipossomas elásticos foi feita incubando-se os lipossomas convencionais pré-formados com o tensoativo descrito a seguir:

Tensoativo: Polioxietilenoglicol-8-lauril ( $C_{28}H_{56}O_{10}$ ), MM 552g/mol, (PEG-8L).

Para a quantificação da porcentagem de PEG-8L incorporada na bicamada lipídica, foi utilizada uma cuba de Langmuir construída no laboratório de físico-química de colóides e superfícies, em parceria com *Insight* instrumentos para laboratórios, Brasil.

Foram feitos ensaios de permeação para a estimativa da elasticidade dos lipossomas utilizando-se membranas de policarbonato com diâmetro de poros de 30nm. Todas as membranas usadas foram da Osmonics Inc.

Membranas constituídas de pele de orelha de porco dermatomizadas também foram utilizadas nos ensaios de permeação. Para dermatomização da pele de orelha de porco, utilizou-se Dermatômetro Nuvag AG e as orelhas de porco foram obtidas de um matadouro local.

As medidas de tensão superficial foram feitas utilizando-se tensiômetro automático modelo OCA-20, Dataphysics, Alemanha.

Foram utilizadas sementes de guaraná em grãos torrados adquiridos da Embrapa – Amazonas, para extração da cafeína.

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Preparação dos lipossomas convencionais**

Os lipossomas convencionais e elásticos foram preparados pelo método de Bangham, (New, 1990) por meio da hidratação do filme seco de lipídios com posterior extrusão em membranas de policarbonato para homogeneização do tamanho das vesículas (Lasic, 1993).

O material utilizado para a formação dos lipossomas convencionais (fosfatidilcolina de ovo) foi estocado a aproximadamente  $-13^{\circ}\text{C}$ , abaixo da

temperatura de transição de fases (0°C). Na temperatura ambiente (25°C), o material foi pesado para obtenção de vesículas na concentração de  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ . Os fosfolipídios foram solubilizados com 10mL de clorofórmio e homogeneizados durante 5 minutos em evaporador rotatório, sendo, posteriormente, promovida à evaporação do solvente sob vácuo (650mmHg) com temperatura acima da temperatura de transição de fases do lipídio ( $T_m$  25°C) até a formação do filme seco. Logo após, o filme seco de lipídios foi hidratado com 10mL de solução tampão HEPES (10mM) pH 7,4 em temperatura ambiente (25°C).

#### **4.2.2 Homogeneização de tamanhos**

As vesículas lipossomais multilamelares formadas pelo método de Bangham foram mantidas em repouso por aproximadamente 2 horas para atingir o equilíbrio. Após este intervalo de tempo, as vesículas foram homogeneizadas quanto ao tamanho pelo método de extrusão em duas membranas de polycarbonato sobrepostas com poros de 100nm de diâmetro. As membranas sobrepostas foram colocadas na extrusora sobre um disco de dreno e um cilindro de nitrogênio foi acoplado a extrusora para aplicação de pressão de aproximadamente 12 atm sobre a dispersão lipossomal. Em seguida, 10 mL da dispersão lipossomal foi colocada na extrusora para dar início à homogeneização de tamanhos, com extrusão de 20 vezes consecutivas da dispersão para obtenção de vesículas unilamelares (Ribas, 1997).

#### **4.2.3 Preparação dos lipossomas elásticos**

Para formação dos lipossomas elásticos, incubou-se os lipossomas convencionais pré-formados com o tensoativo Polioxietilenoglicol-8-lauril (PEG-8L) por 1 hora. Os lipossomas elásticos foram preparados incubando-se os lipossomas convencionais com duas proporções molares de tensoativo, sendo a primeira, com 25% de PEG-8L e a segunda com 40% de PEG-8L. A incorporação do tensoativo na bicamada dos lipossomas pré-formados foi acompanhada por medidas de diâmetro e distribuição de tamanhos em termos de intensidade de luz

espalhada e número de partículas, por espalhamento de luz laser (QLS), microscopia eletrônica de transmissão e medidas de tensão superficial.

#### **4.2.4 Caracterização dos lipossomas**

##### **4.2.4.1 Quantificação do teor de fosfato**

A concentração molar de fosfolipídios foi determinada através da quantificação de fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) presente em solução. No ensaio fosfato, baseado no método desenvolvido por Chen *et al.* (1956), faz-se inicialmente a oxidação das cadeias de ácido graxo com ácido sulfúrico, resultando em carbonos elementares. Após a oxidação, peróxido de hidrogênio livre de fosfato é adicionado, com a finalidade de garantir a oxidação total dos carbonos em dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Assim, o fósforo é transformado em ortofosfato pelo molibdato de amônio, o qual é reduzido pela adição de ácido ascórbico, resultando num complexo de coloração azul determinado colorimetricamente. O procedimento foi feito para soluções padrões com concentrações conhecidas de fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a 1,50, 1,00, 0,75, 0,50 e 0,25  $\text{mol.L}^{-1}$ ) e para solução isenta de fosfato (branco).

As amostras foram adicionadas em tubos de ensaio para a realização deste procedimento. Inicialmente foram adicionadas 2 esferas de vidro nos tubos de ensaio, com a finalidade de melhorar a distribuição de calor durante o aquecimento a qual as amostras foram submetidas, em seguida, adicionou-se 100 $\mu\text{L}$  da amostra de lipossomas, dos padrões e de água deionizada como branco juntamente com 500 $\mu\text{L}$  de solução de ácido sulfúrico 10N. Os tubos de ensaio já com as amostras foram aquecidos numa temperatura de 200°C em placa térmica (Fisatom) num intervalo de tempo de 30 minutos. Retiraram-se os tubos de ensaio da placa térmica e ao atingirem a temperatura ambiente, foram adicionados 165 $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio isento de fosfato, sendo reaquecidos em 200°C por mais 30 minutos. Após os 30 minutos de aquecimento, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente. Após resfriados, adicionou-se aos tubos de ensaio, 4mL de água deionizada Milli-Q, 500 $\mu\text{L}$  de uma solução 2,5% de molibdato de amônio ( $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) e 500 $\mu\text{L}$  de uma solução 8% de ácido ascórbico ( $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_6$ ). A

seguir os tubos foram aquecidos em água quente ( $T \approx 97^\circ\text{C}$ ) durante aproximadamente 7 minutos, e, por fim, a coloração das amostras tornou-se azul. A intensidade da cor azul encontrada, foi medida por um espectrofotômetro com comprimento de onda de 830nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

#### **4.2.4.2 Distribuição de tamanhos e estabilidade dos lipossomas**

O diâmetro médio e distribuição de tamanhos dos lipossomas foram medidas através de espalhamento de luz utilizando um laser, por intermédio da metodologia “quasi elastic light scattering” (QLS) descrito por New (1990).

Para a distribuição de tamanhos das vesículas e determinação do raio hidrodinâmico, utilizou-se uma técnica baseada na determinação do coeficiente de difusão, devido ao movimento Browniano realizado pelas partículas presentes no meio, o qual está relacionado com o tamanho das vesículas pela equação de Stokes–Einstein (Equação 21):

$$D = \frac{\kappa T}{6\pi\eta R} \quad \text{Equação 21}$$

onde:

$\kappa$  é a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura absoluta,  $R$  o raio das vesículas e  $\eta$  a viscosidade da solução dispersante.

O equipamento foi regulado para um ângulo de  $90^\circ\text{C}$  em relação ao feixe de luz incidente (laser He-Ne) para a realização das medidas e as amostras foram diluídas com tampão HEPES (10mmol/L e pH 7,4) para reduzir a turbidez das dispersões e posteriormente inseridas no equipamento para a detecção das medidas pelo software PCS.

A Figura 16 apresenta de modo esquemático a realização de medidas do raio hidrodinâmico e distribuição das partículas em dispersão coloidal.

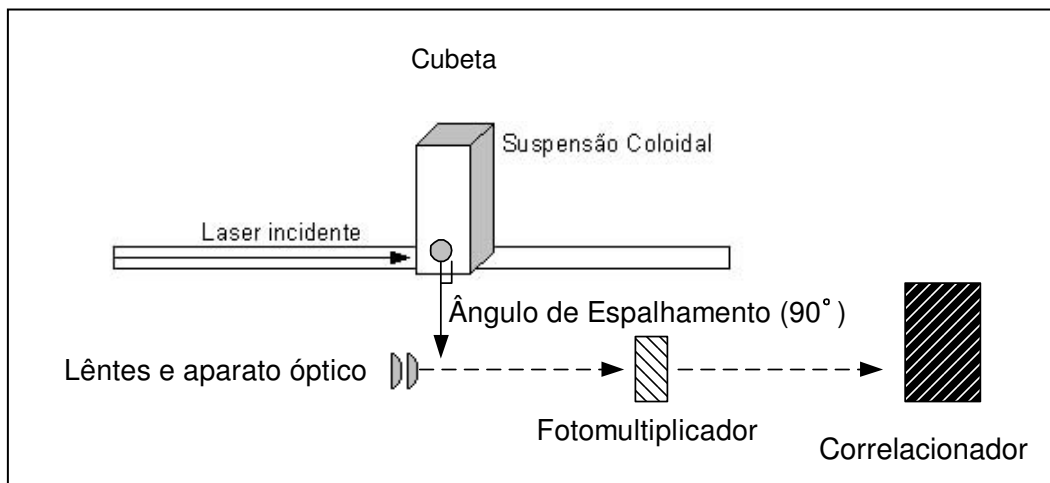


Figura 16 - Modelo esquemático do equipamento para determinação de medidas de tamanho das vesículas por espalhamento de luz.

Os dados referentes à distribuição de tamanhos das partículas, confiabilidade das medidas e polidispersidade da amostra foram fornecidos pelo software acoplado ao equipamento.

A estabilidade física dos lipossomas elásticos nas duas proporções, 25 % e 40 % de PEG-8L foram avaliada através das variações de diâmetro e distribuição de tamanhos das partículas ao longo de 24 horas.

#### 4.2.5 Estimativa do número de lipossomas em solução

Com a determinação do diâmetro dos lipossomas e do teor de fosfolipídios na amostra, é possível estimar o número de vesículas presentes na amostra (Israelachvili, 1992)

Inicialmente, foi calculado o número de fosfolipídios presentes na vesícula a partir da estimativa da área ocupada pela cabeça polar da molécula ( $A_t$ ). Como o lipossoma é uma vesícula composta por bicamada, o número de moléculas presentes na camada externa ( $n_e$ ) é dado por:

$$n_e = \frac{A_e}{A_i} \quad (\text{Eq. 22})$$

A área externa  $A_e$  foi calculada a partir do diâmetro médio da vesícula ( $D$ ), determinado por QLS:

O número de lipídios na camada interna ( $n_i$ ) é calculado como exposto na Equação 21. O diâmetro interno é a diferença entre o diâmetro externo e a espessura da camada lipídica ( $\delta$ )

$$A_i = \pi(D - \delta)^2 \quad (\text{Eq. 23})$$

O total estimado de moléculas no lipossoma ( $n_t$ ) é a soma de  $n_e$  e  $n_i$ . Determinado o número de moléculas de fosfolipídio na solução ( $n_f$ ) através do ensaio fosfato, o número de vesículas ( $n_v$ ) pode ser estimado pela Equação 23.

$$n_v = \frac{n_f}{n_t} \quad (\text{Eq. 24})$$

#### 4.2.6 Medidas de tensão superficial

Foram feitas medidas de tensão superficial para a dispersão lipossomal e para os lipossomas elásticos nas duas proporções a serem utilizadas, 25 e 40 % de tensoativo. As tensões superficiais foram medidas pelo método da gota pendente, empregando o método da análise do perfil eixo-simétrico da gota (ADSA), (Rotenberg *et al.*, 1983 e Cheng *et al.*, 1990) usando um tensiômetro automático modelo OCA-20, Dataphysics, Alemanha. Para tal, uma gota da dispersão lipossomal formada por uma seringa foi acoplada a uma bomba de injeção, na extremidade de uma agulha com ponta reta e diâmetro conhecido, contida em uma cubeta ótica contendo um certo volume da dispersão, para manter a atmosfera saturada, de forma a evitar a evaporação da gota durante as medidas

(Figura 17). Dessa forma, a gota pôde ser filmada por meio de uma câmara CCD. Um programa com processo de disparo programado de filmagem, a partir do posicionamento conveniente de uma linha de referência, permite filmar imagens mesmo antes da formação da gota.

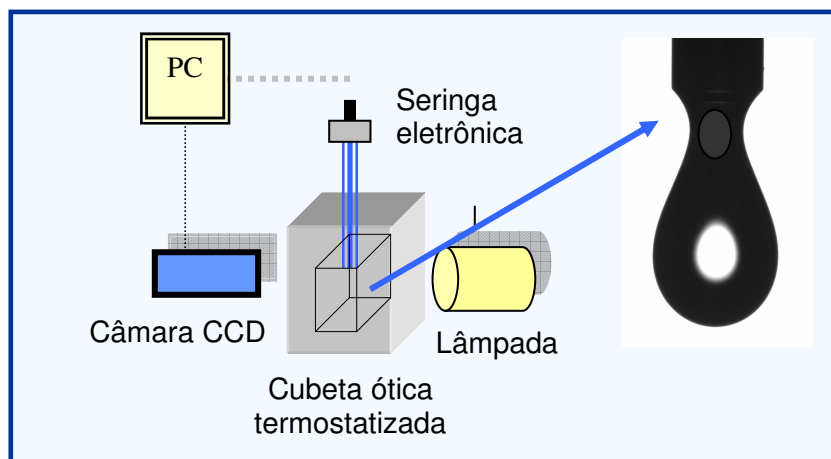


Figura 17 - Aparato experimental para as medidas de tensão superficial pelo método da gota pendente.

A tensão superficial ( $\gamma$ ) foi determinada digitalizando a imagem e analisando o seu perfil, ajustando-o à equação de Young-Laplace:

$$\Delta P = (\rho_d - \rho_l) g h = (\gamma/R_1) + (\gamma/R_2) \quad (\text{Eq. 25})$$

para a qual  $\Delta P$  corresponde à diferença de pressão entre o interior e a parte externa da gota;  $\rho_d - \rho_l$  são as densidades da fase líquida e do ar, respectivamente;  $g$  é aceleração da gravidade,  $h$  altura da coluna líquida na gota e  $R_1$  e  $R_2$  os dois raios principais de curvatura.

Para garantir a limpeza do equipamento, antes de se iniciar cada experimento, medidas de tensão superficial para água pura foram efetuadas. Só então, após a limpeza, é que a solução contendo tensoativo foi injetada.



A gota foi formada com a ajuda de uma bomba de injeção, programada para injetar um volume igual a 18  $\mu\text{L}$ . O cronômetro foi acionado no início da injeção da solução, antes que a gota fosse formada.

#### **4.2.6.1 Concentração micelar crítica**

Para determinação da concentração micelar crítica, primeiramente fez-se diluições do tensoativo PEG8-L puro em solução aquosa para medir a tensão superficial em várias concentrações (0,005; 0,015; 0,025; 0,03; 0,05; 0,06; 0,07; 0,12; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7  $10^{-3}\text{mol.L}^{-1}$ ), e posteriormente construir uma curva de calibração. A curva de calibração foi construída com medidas da tensão superficial versus concentração molar de tensoativo. Posteriormente, adicionou-se as mesmas concentrações de PEG-8L puro em dispersão lipossomal ( $1.10^{-3}\text{mol.L}^{-1}$ ) para que se verificasse a influencia dos lipossomas na tensão superficial do tensoativo. As medidas de tensão superficial para as amostras foram feitas imediatamente após a mistura dos lipossomas vazios com o tensoativo. As leituras foram feitas em triplicata para garantir a reprodutibilidade dos dados. Determinou-se a CMC do tensoativo graficamente pela intersecção de duas retas traçadas a partir dos dados experimentais de tensão superficial em função da concentração de tensoativo puro e posteriormente fez-se o mesmo procedimento para o tensoativo na presença de lipossomas.

#### **4.2.6.2 Porcentagem de incorporação de PEG-8L**

A porcentagem de incorporação de PEG-8L na monocamada lipídica foi determinada pelo método da monocamada de Langmuir, Langmuir-Insight (Brasil) conforme metodologia estabelecida por Zaniquelli *et al.* (1993). Primeiramente, espalhou-se fosfatidilcolina de ovo dissolvida em clorofórmio sobre uma cuba de Langmuir contendo água e esperou-se aproximadamente 15 minutos para evaporação do solvente e iniciar-se a compressão da monocamada, a uma velocidade de  $0,58\text{mm.s}^{-1}$  até a pressão de  $30\text{ mN.m}^{-1}$  (pressão aproximada encontrada em membranas biológicas) (Demel *et al.*, 1975; Evans and Waugh, 1977; Blume, 1979; Cevc *et al.*, 1986). Nesse valor de pressão atingido pela

monocamada foi então injetado na subfase o PEG-8L, correspondente à concentração inicial de  $0,25 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , ou seja, 25 % em relação aos lipossomas. As variações de pressão superficial foram registradas em função do tempo para a construção da curva de cinética de incorporação do PEG-8L em monocamada de Langmuir de fosfatidilcolina de ovo. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi feito para 40 % de PEG-8L.

A concentração de tensoativo incorporada na bicamada lipídica foi determinada por intermédio da equação 26:

$$C_{INC} = C_i - C_n \quad (\text{Eq. 26})$$

onde,  $C_{INC}$  é a concentração de PEG-8L incorporada na bicamada lipídica,  $C_i$  é a concentração inicial de PEG-8L adicionada a dispersão lipossomal e  $C_n$  é a concentração de PEG-8L não incorporada na bicamada lipídica.

A porcentagem de PEG-8L incorporada na bicamada foi expressa em termos de porcentagem total de PEG-8L na dispersão lipossomal.

$$\%_{INC} = [1 - (C_n / C_i)] \times 100 \quad (\text{Eq. 27})$$

#### **4.2.7 Morfologia dos lipossomas**

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para se visualizar e analisar as morfologias encontradas para as diferentes estruturas lipídicas. Conforme metodologia proposta por Torre (2006), utilizou-se telas de cobre de 200 mesh como suporte para a amostra recoberta com carbono com filme de colódio (parlordin com acetato de celulose). Uma gota da dispersão lipossomal ( $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) foi aplicada sobre a tela e incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente, sendo posteriormente retirado o excesso de solução lipídica. Uma gota de acetato de uranila 1% p/v (em solução salina 0,9%) foi então

adicionada mantendo-se incubação durante 1 minuto a temperatura ambiente, sendo também o excesso eliminado e a tela seca em ar. As estruturas foram visualizadas em microscópio Carl Zeiss, CEM 902, equipado com filtro de energia Castaing-Henry-Ottensmeyer, sendo as imagens adquiridas através de câmera CCD câmera (Proscan).

#### **4.2.8 Ensaios de permeação**

Os ensaios de permeação foram feitos para os lipossomas convencionais, para o PEG-8L e para os lipossomas elásticos com 25% e 40 % de PEG-8L, para determinação da elasticidade dos lipossomas e análise de seu comportamento ao passar pelos poros que simulam os poros da pele humana. Para realização da permeação, foi utilizada a mesma extrusora especificada na homogeneização de tamanhos acoplada ao cilindro de nitrogênio para simulações com pressões que variaram de 2,5 atm até 20 atm, e acoplada a um banho com camisa térmica para circulação de água aquecida numa temperatura de 37<sup>0</sup>C simulando a permeação na pele humana. A permeação foi feita utilizando-se 2 membranas sobrepostas com poros de 30nm de diâmetro e, 1mL da dispersão lipossomal. Para os ensaios de permeação, diferentemente da extrusão para homogeneização de tamanhos, a passagem através das membranas foi de somente uma vez. Determinou-se, desta forma, o coeficiente de permeabilidade por meio da Lei de Darcy, analisando-se a reologia das dispersões lipossomas, com medidas de vazão *versus* queda de pressão, diâmetro e distribuição de tamanhos das partículas, sua morfologia e tensão superficial.

Esses ensaios foram realizados e analisados quanto ao diâmetro e distribuição de tamanhos imediatamente após a permeação, ou seja, tempo de aproximadamente 0,08 hora e acompanhados ao longo de 24 horas.

#### **4.2.9 Ensaios de permeação *in vitro* em pele de porco dermatomizada**

Os ensaios *in vitro* de permeação dos lipossomas foram realizados com pele de porco dermatomizadas utilizando-se Dermatômetro Nouvag AG para a obtenção da epiderme mais metade da derme. Para os ensaios de permeação a

pele de orelha de porco foi colocada na extrusora com o lado da derme em contato com a solução receptora. Os experimentos foram conduzidos a 37°C.

#### **4.2.10 Cafeína**

##### **4.2.10.1 Extração da cafeína**

A cafeína utilizada para a incorporação foi extraída de sementes da planta do guaraná (*Paullinia cupana*) com dióxido de carbono supercrítico e co-solventes, segundo metodologia desenvolvida por Kopcak (2003). O guaraná em grãos torrados utilizados para extração da cafeína foi obtido da EMBRAPA do Estado de Amazonas, Brasil.

As sementes de guaraná torradas foram moídas e peneiradas antes da extração supercrítica com CO<sub>2</sub> e co-solventes. Após a extração, tem-se uma solução de cafeína em álcool etílico. Para obtenção da cafeína em pó o álcool foi evaporado, sendo que o pó obtido apresentou-se oleoso e escuro, sugerindo-se que tenham sido extraídos outros flavonóides juntamente com a cafeína. Como a cafeína é solúvel em água, este composto parcialmente seco e oleoso foi diluído em água. Após a diluição em água, obteve-se uma solução branca e um sobrenadante oleoso.

##### **4.2.10.2 Incorporação da cafeína nos lipossomas**

Os lipossomas foram preparados de acordo com os itens 4.2.1 e 4.2.3. A solução de cafeína, preparada conforme o item 4.2.10.1, foi adicionada aos lipossomas na etapa de hidratação do filme seco de lipídios. A concentração da solução de cafeína adicionada aos lipossomas na etapa de hidratação do filme seco foi de  $1 \cdot 10^{-4}$  mmol.L<sup>-1</sup>, ou seja, 10 vezes menor que a concentração dos lipossomas. Os lipossomas incorporando cafeína foram sonificados, por 15 minutos, em sonificador Vibra Cell de modelo VC50, para homogeneização dos tamanhos das vesículas. Após a sonicação, o sobrenadante oleoso que estava presente na solução de cafeína antes da incorporação se solubilizou na solução lipossomal.

#### **4.2.10.3 Separação da cafeína não incorporada nos lipossomas**

Após a homogeneização de tamanhos por sonicação, fez-se a ultrafiltração (UF). A ultrafiltração foi necessária neste trabalho para separar a cafeína não incorporada da solução lipossomal. A membrana utilizada para a ultrafiltração foi PAN/PVC copolímero, código Xm50 e diâmetro de 44,5 mm.

Inicialmente adicionou-se no recipiente graduado do aparelho um volume de 10 mL da solução lipossomal usada na incorporação. Manteve-se o recipiente graduado já com a solução sob agitação em rotação baixa sobre agitador magnético e uma pressão baixa de cerca de 2,5 – 3 atm. A UF foi então iniciada e o filtrado foi sendo liberado por uma abertura lateral do recipiente. O ensaio foi interrompido quando o volume do recipiente de coleta do ultrafiltrado atingiu o volume da solução adicionada no recipiente graduado, neste caso o volume de 10mL. A solução do filtrado contendo apenas a cafeína não incorporada mais traços de fosfolípidos foi posteriormente analisada em espectrofotômetro para determinação da concentração da cafeína por meio da leitura da absorbância das amostras a 270nm (Touitou, *et al.* 1992).

#### **4.2.10.4 Quantificação da cafeína incorporada nos lipossomas**

Os valores das concentrações de cafeína incorporada nos lipossomas foram obtidos por intermédio de uma curva de calibração feita (Anexo 1) medindo-se as absorbâncias das soluções de cafeína pura em água em várias concentrações diferentes de cafeína, por intermédio de um espectrofotômetro de marca HP 84453. Foi utilizado um comprimento de onda de 275 nm, o qual é capaz de quantificar por absorbância a cafeína em solução. Poderiam ter sido usados valores de 272 a 275 nm, aceitos pela literatura como picos adequados de máxima absorbância. (Touitou, *et al.* 1992). A porcentagem de incorporação de cafeína foi calculada a partir da Equação 28:

$$\% \text{ INCORPORAÇÃO CAFEÍNA} = [1 - (C_{\text{FILTRADA}} / C_{\text{INICIAL}})] \times 100 \quad (\text{Eq. 28})$$

## **5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

### **5.1 Preparação e Caracterização dos Lipossomas Convencionais**

#### **5.1.1 Rendimento em relação ao teor de fosfato**

Os lipossomas convencionais de lecitina de ovo, preparados pelo método laboratorial de Bangham, ou da hidratação do filme seco de lipídios, apresentaram rendimento em relação ao teor de fosfolipídios da ordem de 100%, para uma concentração inicial de fosfolipídios de  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ . Este resultado significa que, todo o fosfolipídio inicial foi transportado para a dispersão durante a hidratação do filme seco previamente formado.

#### **5.1.2 Diâmetro médio e distribuição de tamanhos**

Após o repouso da amostra durante 2 horas, após a preparação, tempo necessário para a consolidação e acomodação da agregação dos lipídios em bicamada, o diâmetro e distribuição de tamanhos foram caracterizados através da intensidade de espalhamento de luz e distribuição de tamanhos em termos de número de vesículas para o diâmetro correspondente. Os resultados obtidos no período de 24 horas são mostrados na Figura 18 e Tabela 2.

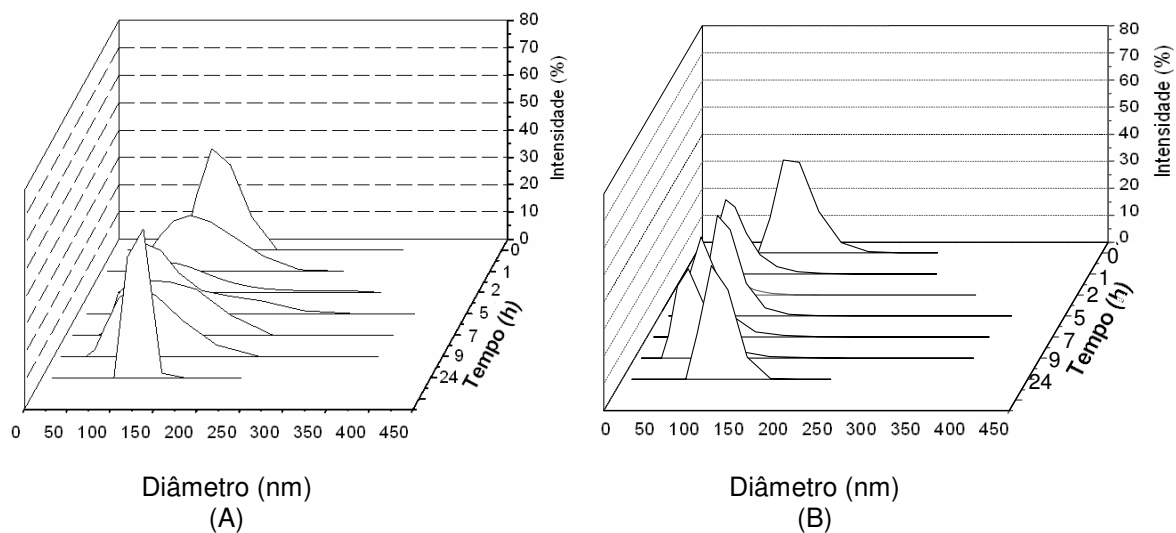


Figura 18 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas convencionais de lecitina de ovo ( $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) (a) intensidade de luz espalhada (b) número de vesículas.

Tabela 2 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas convencionais de lecitina de ovo determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b><i>Intensidade</i> (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
0	90 – 160 (100% - 103,4)	80 – 190 (100% - 104)
1	37,9 – 230 (100% - 105,4)	31 – 153,8 (100% - 53,3)
2	33,7 – 337,4 (100% - 106)	33,7 – 151,5 (43,3% - 39,3; 56,7% - 61,3)
5	64,4 – 261,7 (100% - 106,4)	52,7 – 175,3 (100% - 73,4)
7	47,8 – 190,3 (100% - 106,7)	37,9 – 190,3 (100% - 64,4)
9	47,3 – 188,2 (100% - 101,7)	37,5 – 188,2 (100% - 62,5)
24	98,8 – 138,8 (100% - 109,3)	83,3 – 164,5 (100% - 105,5)

No tempo zero, após o repouso da amostra para acomodação da agregação dos lipídios, as vesículas apresentaram diâmetro médio semelhantes, de aproximadamente 104 nm para análises de intensidade de luz espalhada e número de vesículas. Nos tempos de 1 até 9 horas, os diâmetros das vesículas analisados em termos de intensidade de luz espalhada não se alteraram significativamente, porém, em termos de número, as vesículas apresentaram média de aproximadamente 60 nm. Em 24h, o diâmetro assumiu o valor médio 108 nm (aproximadamente) e distribuição estreita em ambas as análises: intensidade (faixa de 98 a 138,8 nm) e número (83,3 a 164,5 nm).



De acordo com a literatura do campo de medidas de diâmetro hidrodinâmico por espalhamento dinâmico de luz, utilizando-se a análise de PCS, a intensidade de espalhamento de luz é proporcional à sexta potência do diâmetro das partículas, enquanto que a análise por número é proporcional à primeira potência do diâmetro (Hanus e Ploehn, 1999; Patty e Frisken, 2006). Portanto, a presença de partículas grandes na dispersão, resulta em uma intensidade de espalhamento grande, mesmo em pequena concentração. Adicionalmente, a literatura também ressalta que a análise por intensidade é a mais precisa, sendo que a análise por número, dela derivada, acumula erros, de modo que algumas vezes é considerada como qualitativa.

No caso da análise de diâmetros deste trabalho, é imprescindível a informação tanto da presença de toda a faixa de tamanhos identificada pela distribuição em intensidade, quanto dos tamanhos analisados em termos de número de vesículas.

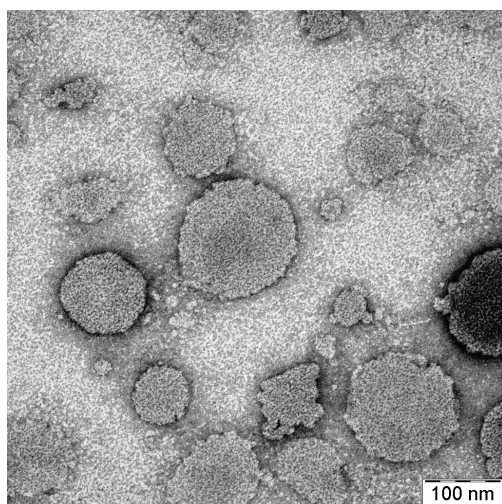
### **5.1.3 Morfologia**

As micrografias apresentadas na Figura 19 mostraram a morfologia dos lipossomas convencionais de lecitina de ovo na concentração  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  preparados pelo método de Bangham e com tamanhos homogeneizados em pressão de 12 atm e 20 passagens através de duas membranas sobrepostas de diâmetro de poros 100 nm. Essas micrografias foram obtidas com amostras estocadas durante 24 horas.

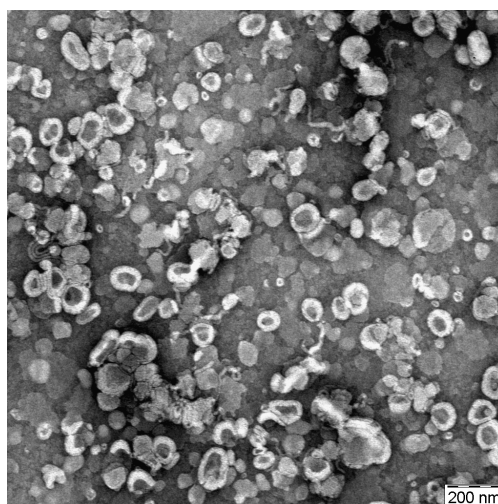
As imagens mostraram uma ampla distribuição de tamanhos. A Figura (19a) mostra vesículas de tamanhos na ordem de 100 nm, semelhantes aos tamanhos determinados por PCS. A presença de vários agregados nas imagens (19, c e d) provavelmente são decorrentes da secagem da amostra. As partículas mais escuras em relevo são os lipossomas, enquanto que os agregados mais claros são decorrentes do sal da solução tampão utilizado na preparação dos lipossomas. Observou-se nos vários campos que as vesículas não são perfeitamente esféricas apresentando também formas elipsoidais alongadas,

provavelmente devido à fluidez da membrana lipídica dos lipossomas de lecitina de ovo, que à temperatura ambiente apresentam-se na fase de líquido cristalino.

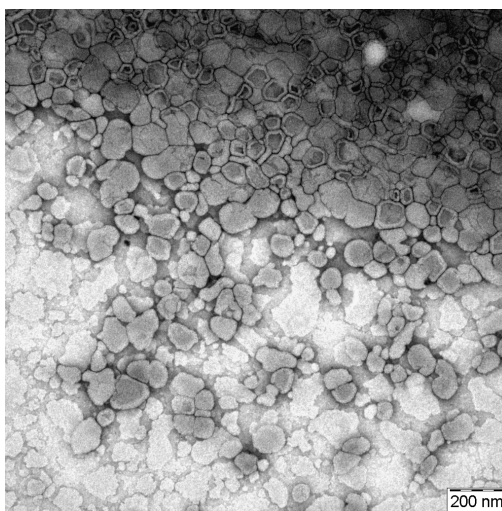
As bordas espessas que aparecem na micrografia (19b) podem ser resultantes da fusão ou da presença de mais de uma lamela nos lipossomas maiores.



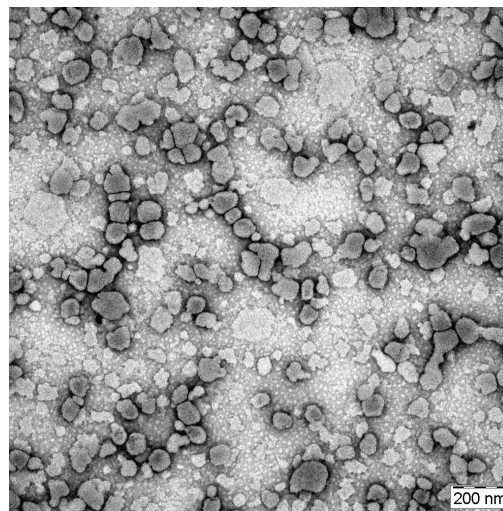
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 19 - Micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão de lipossomas convencionais preparados pelo método de Bangham e

homogeneizados através de extrusão à média pressão (12 atm) e 20 passagens através de duas membranas sobrepostas de diâmetro de poros 100nm.

#### **5.1.4 Estabilidade físico-química**

A estabilidade físico-química dos lipossomas convencionais foi avaliada através de medidas de diâmetro médio e distribuição de tamanhos, conforme descritos no item 5.1.2. Os resultados obtidos ao longo de 24 horas foram mostrados na Figura 18 e Tabela 2, conferindo estabilidade das vesículas lipídicas, mantidas sob refrigeração (5<sup>0</sup> C), quanto ao tamanho.

Resultados adicionais mostraram que essa distribuição manteve-se durante 60 dias de estocagem. A partir desses resultados pode-se concluir que a dispersão de lipossomas preparada a partir de lecitina de ovo é estável, apresentando uma variação estreita de diâmetros, com média em 108 nm aproximadamente.

Após 60 dias não se obteve uma avaliação conclusiva da estabilidade físico-química dos lipossomas devido à presença de contaminação microbiana nas amostras mesmo sob refrigeração.

### **5.2 Preparação e Caracterização dos Lipossomas Elásticos**

A preparação dos lipossomas elásticos foi feita com a incorporação de PEG-8L nos lipossomas convencionais, através de incubação durante 1 hora, conforme método descrito no item 4.2.3. Desta maneira, o PEG-8L presente no seio da solução migra para a bicamada lipídica onde insere a sua cadeia de ácido graxo, deixando a sua porção polimérica livre na superfície do lipossoma.

#### **5.2.1 Incorporação do PEG-8L**

A quantificação do PEG-8L incorporado foi feita através de medidas da tensão superficial decorrente da sua inserção em monocamada lipídica, conforme descrito no item 4.2.6.2. A concentração do PEG-8L incorporado resultante do

equilíbrio na incorporação, foi determinada através de curva de tensão superficial *versus* concentração do referido polímero em água deionizada, previamente construída.

A Figura 20 apresenta a curva de tensão superficial do PEG-8L em água. Observou-se que a presença do polímero anfifílico decresce sensivelmente a tensão superficial da água ( $72,8 \text{ mN.m}^{-1}$ ), em uma faixa ampla de concentrações, citadas no item 4.2.6.1, devido à sua grande interação com a água. A concentração micelar crítica obtida foi  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Adicionalmente, foi também determinada a curva para o tensoativo peguado, agora em presença da dispersão de lipossomas  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , com medidas feitas imediatamente após a adição do PEG-8L, ou seja, de modo que a sua incorporação seja desprezível. Observou-se também, que a presença de lipossomas reduz a tensão superficial da água e que na concentração  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , a presença dos lipossomas não interfere significativamente na tensão superficial do PEG-8L puro. Nessas condições, a concentração micelar crítica do sistema foi  $0,089 \text{ mol.L}^{-1}$ .

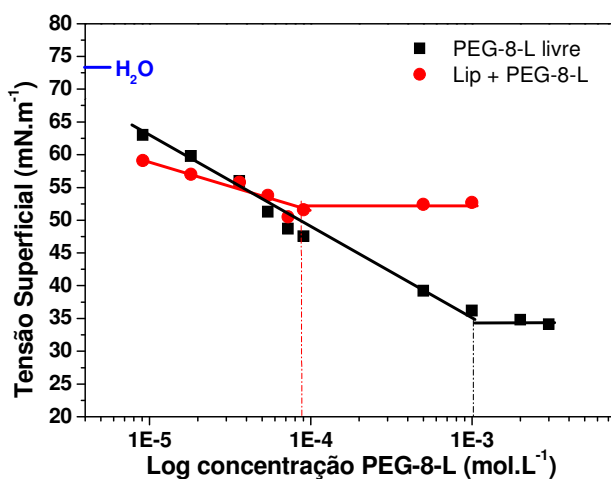


Figura 20 - Curva para determinação de CMC do PEG-8L livre em solução (■) e do PEG-8L na presença de lipossomas (●).

Nos experimentos utilizando a balança de Langmuir para a quantificação da incorporação do PEG-8L na monocamada lipídica de lecitina de ovo, foram

obtidos os seguintes resultados: inicialmente, após a adição da lecitina na concentração  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , a pressão superficial medida foi  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ . Quando injetou-se 25 % de PEG-8L na subfase (Figura 21a) observou-se uma elevação na pressão de superfície, correspondente à incorporação do PEG-8L na monocamada lipídica. No patamar de estabilização, a pressão de superfície medida foi  $49,97 \text{ mN.m}^{-1}$ . Portanto, a variação na pressão de superfície ou tensão superficial correspondente à incorporação do PEG-8L ( $19,97 \text{ mN.m}^{-1}$ ) foi calculada pela diferença entre esses dois valores.

Tomando-se como referência a superfície limpa (água pura), a tensão superficial correspondente à variação de  $19,97 \text{ mN.m}^{-1}$  foi obtida subtraindo-se a tensão superficial da água ( $72,8 \text{ mN.m}^{-1}$ ) desse valor, obtendo-se assim,  $52,83 \text{ mN.m}^{-1}$ . Desse modo, foi possível determinar a concentração de PEG-8L incorporado,  $5,24 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ , utilizando a curva de tensão superficial do PEG-8L em água da Figura 20.

O mesmo procedimento foi utilizado para obtenção da percentagem de incorporação de 40% de PEG8-L (Figura 21b).

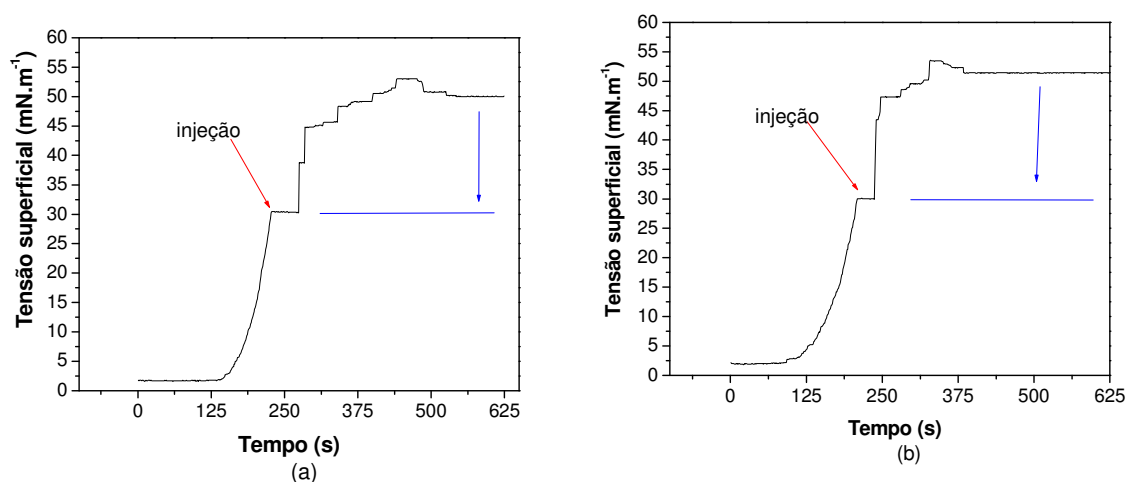


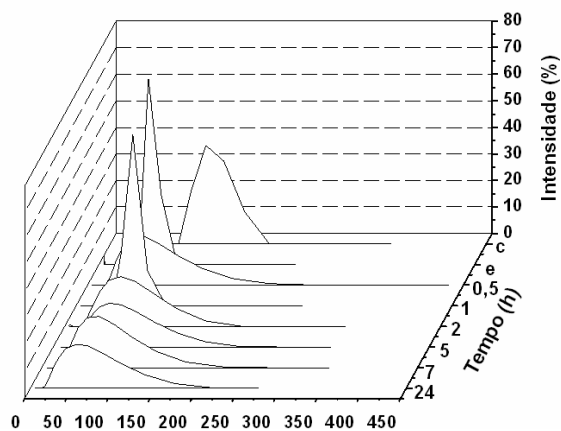
Figura 21 - Perfis de tensão de superfície de monocamada de lecitina de ovo com a injeção de PEG-8L nas concentrações (a)  $0,25.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  e (b)  $0,40.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , correspondentes às proporções molares lecitina:PEG-8L 75:25 e 60:40 respectivamente.

A partir das concentrações iniciais usadas nas preparações com 25% e 40% de PEG-8L, as porcentagens de incorporação para uma monocamada lipídica obtidas através da equação 27, foram 20,4% e 15,4 % respectivamente. A proximidade entre esses valores indica que a saturação da superfície dos lipossomas para a incorporação de PEG-8L é da ordem de 15 a 20% da concentração molar de lipídio.

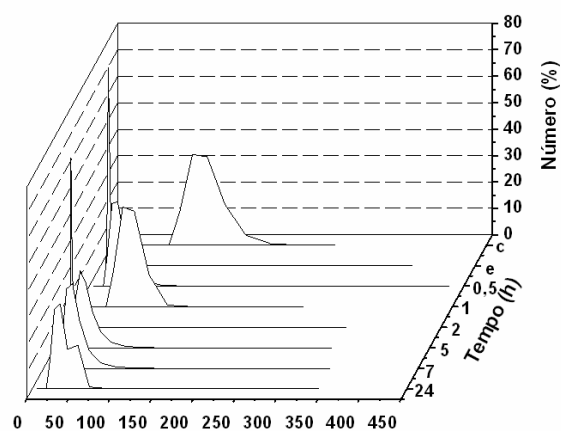
Considerando que a preparação dos lipossomas elásticos foi feita por incubação de lipossomas convencionais com o polímero anfifílico, o PEG-8L foi incorporado somente na monocamada externa dos lipossomas. Deste modo, pôde-se extrapolar os valores obtidos em monocamada de Langmuir, como estimativa da percentagem de PEG-8L incorporada nos lipossomas elásticos.

### **5.2.2 Diâmetro e distribuição de tamanhos**

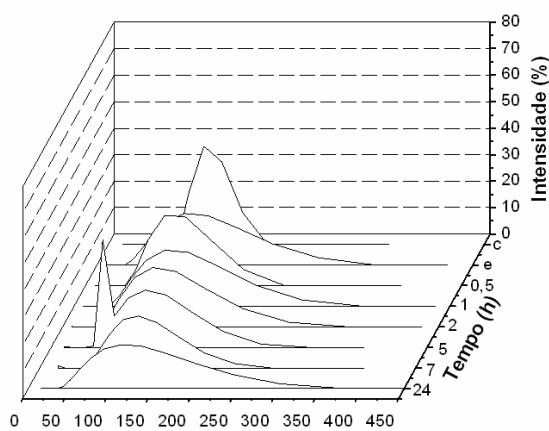
A Figura 22 apresenta a distribuição de tamanhos dos lipossomas após a incorporação do PEG-8L para ambas as concentrações (25 % e 40%), comparativamente à distribuição dos lipossomas convencionais, e a estabilidade das dispersões de lipossomas elásticos durante 24 horas.



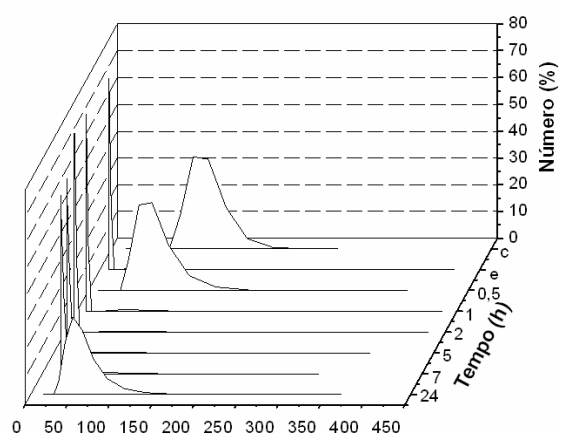
Diâmetro (nm)  
(A)



Diâmetro (nm)  
(B)



Diâmetro (nm)  
(C)



Diâmetro (nm)  
(D)

Figura 22 - Distribuição de tamanhos após a incorporação do PEG-8L para os lipossomas elásticos, comparativamente à distribuição dos lipossomas convencionais, durante 24 horas. (A, B) 25% de PEG-8L e (C,D) 40% de PEG-8L

c – lipossomas convencionais (antes da incorporação do PEG-8L).  
e - lipossomas elásticos (após a incorporação do PEG-8L).

As Tabelas 3a e 3b resumem as distribuições de tamanhos e diâmetros médios obtidos.

Tabela 3a – Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos na proporção 75:25, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) em termos de intensidade de luz espalhada e número de partículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm) para a proporção 75:25</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
c	98,8 – 138,8 (100% - 109,3)	83,3 – 164,5 (100% - 105,5)
e	5,9; 90 – 160 (3,5% - 5,9; 92% - 63,4)	5,9 – 7,4 (100% - 6,3)
0,5	27,3 – 216,7 (100% - 72,7)	21,6 – 108,6 (100% - 34,1)
1	46,9 – 156 (100% - 108,3)	38,4 – 190,6 (100% - 57,8)
2	5,4; 23,1 – 221 (100% - 71,5)	5,4 – 6,8 (100% - 6,2)
5	24,6 – 222,9 (100% - 77,9)	20,2 – 100,1 (100% - 35,1)
7	27,3 – 217,2 (100% - 72,4)	21,7 – 108,8 (100% - 34,9)
24	26,2 – 216,5 (100% - 71,4)	18 – 104,3 (100% - 34,3)

c – lipossomas convencionais (antes da incorporação do PEG-8L).

e - lipossomas elásticos (após a incorporação do PEG-8L).



Tabela 3b – Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos na proporção 60:40, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) em termos de intensidade de luz espalhada e número de partículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm) para a proporção 60:40</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
c	98,8 – 138,8 (100% - 109,3)	83,3 – 164,5 (100% - 105,5)
e	30 – 290 (100% - 62)	7,1 – 8,2 (100% - 7,4)
0,5	59,8 – 189,2 (100% - 111,0)	47,5 – 189,2 (100% - 74,1)
1	43,2 – 272,9 (98,7% - 126,3)	10,9 – 13,7; 34,3 – 108,6 (98,2% - 11,6; 1,8% - 64,5)
2	10,8; 54 – 271,0 (100% - 123,1)	10,8 – 13,6; 42,9 – 107,8 (99,3% - 11,5)
5	15,2 – 18,6; 50,6 a 251,2 (97,1% - 121,9)	15,2 – 22,7; 50,6 – 92,3 (99,5% - 16,6)
7	21,6 – 233,4 (1,1% - 22,8; 95,6% - 122,1)	21,6 – 30,3; 50,5 – 118,2 (98,2% - 23; 1,8% - 79,6)
24	40,7 – 368,4 (100% - 128,6)	33,3 – 202,0 (100% - 57,8)

c – lipossomas convencionais (antes da incorporação do PEG-8L).

e - lipossomas elásticos (após a incorporação do PEG-8L).

De acordo com a Figura 22 e Tabelas 3a e 3b, inicialmente observou-se a distribuição de tamanhos para os lipossomas convencionais estocados durante 24 horas sob refrigeração (5<sup>o</sup> C), após a preparação, cuja distribuição de tamanhos e diâmetro médio foram apresentados conforme item 5.1.2. Após adição de 25 % PEG-8L para preparação dos lipossomas elásticos (e), observou-se alterações na faixa de distribuição de tamanhos quando comparadas aos lipossomas convencionais (c). Para tal, observou-se que, imediatamente após a adição do

PEG-8L, os tamanhos das partículas foram alterados significativamente, apresentando diâmetro médio 5,9 nm para 3,5% das partículas e 63,4 nm para 92%, em termos de intensidade de luz espalhada. Na análise por número, a distribuição de tamanhos situou-se entre 5,9 e 7,4 nm, com média 6,3 nm para a totalidade das partículas. Essa diminuição significativa na faixa de distribuição de tamanhos e diâmetro médio das partículas, em relação aos lipossomas convencionais, representa a re-estruturação de tamanhos dos lipossomas em consequência da incorporação do PEG-8L.

Nos tempos de 0,5 até 24 horas, a distribuição de tamanhos oscilou alternadamente, mantendo média de 70 nm em termos de intensidade de luz espalhada. Porém, em termos de número, nesse mesmo intervalo de tempo (0,5 – 24 horas), as partículas apresentaram oscilações quanto ao diâmetro. A partir de 5 até 24 horas de estocagem, as vesículas elásticas apresentaram estabilidade quanto aos tamanhos, que se apresentaram na faixa de 20 a 200 nm, com diâmetro médio em torno de 70 nm (intensidade de luz espalhada). Em termos de número, apresentaram distribuição de tamanhos na faixa de 20 a 100 nm, com média em torno de 35 nm para a totalidade das partículas.

A predominância dos tamanhos menores apresentados nas distribuições em termos de número de partículas é semelhante à obtida para os agregados de PEG-8L livres em solução, que apresenta faixa de 9,9 a 24,8 nm e 49,6 a 312,9 nm, com 19,3% das micelas apresentando 15,7 nm e 79,1%, 130,7 nm, em termos de intensidade de luz espalhada. Em termos de número, faixa de tamanhos entre 9,9 a 24,8 nm, com média 11,8 nm. Portanto, as distribuições obtidas foram coerentes, mostrando que, além da presença dos lipossomas, há grande concentração de agregados de PEG-8L livres no meio. Esses resultados foram coerentes com a baixa percentagem de incorporação do PEG-8L nos lipossomas, determinada anteriormente.

Destes resultados, conclui-se que a distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos permanece estável a partir de 5 horas de preparação.

Observou-se que essa estabilidade foi mantida por 60 dias de estocagem sob refrigeração.

Os lipossomas incubados com PEG-8L (40%) apresentaram diâmetros menores que com 25% de PEG-8L, quando analisados em termos de número, demonstrando assim, maior perturbação sofrida pelo sistema quando da incorporação do tensoativo. Em termos de intensidade de luz espalhada, o diâmetro médio das partículas após adição de 40 % de PEG8-L, foi de 62 nm. Em termos de número, observou-se predominância de tamanhos na faixa de 6,1 a 8,2 nm, com diâmetro médio 7,4 nm.

A partir de 0,5 até 24 horas de estocagem, não se observam alterações significativas na faixa de distribuição de tamanhos das vesículas em termos de intensidade de luz espalhada (aproximadamente 120 nm). Em termos de número, no tempo de 0,5 horas, a distribuição de tamanhos variou entre 47,5 a 189,2 nm, apresentando média de 74,1 nm. A partir de 1 até 7 horas, o comportamento foi significativamente menor quando comparados ao dos lipossomas elásticos com 25% de PEG-8L. Em 24 horas a faixa de tamanhos esteve entre 33,3 e 202 nm, com média 57,8 nm. Do mesmo modo que no caso anterior (25% de PEG-8L), os resultados mostram a grande quantidade de PEG-8L livre após a incubação e a sua manutenção durante a estocagem.

### 5.2.3 Morfologia

A Figura 23 apresenta micrografias para solução de PEG-8L puro, na concentração de  $0,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ .

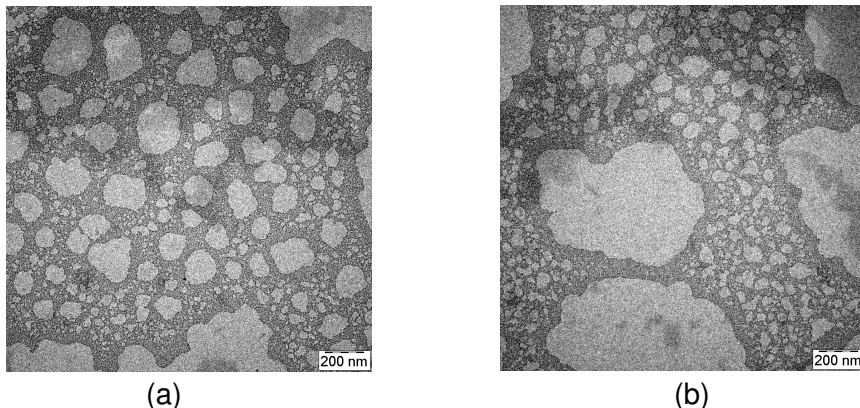
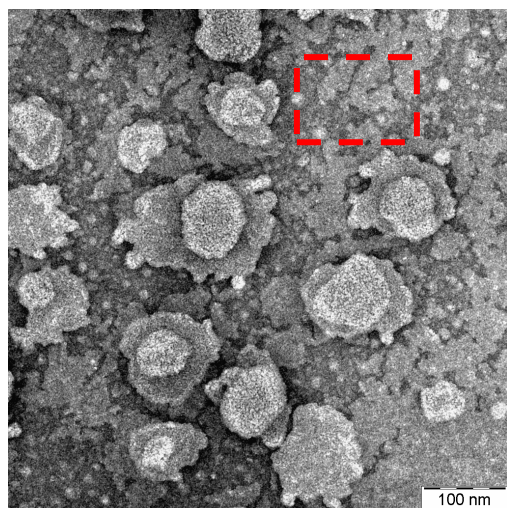


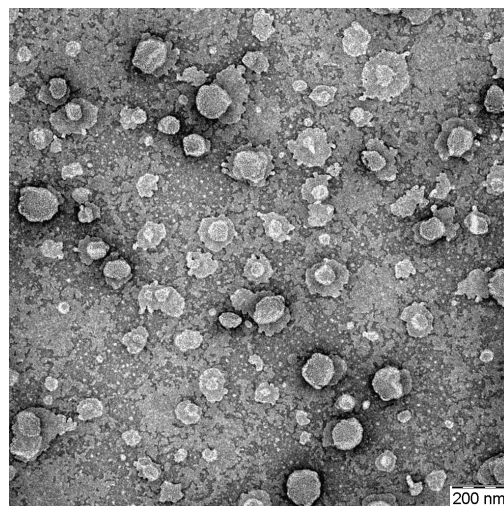
Figura 23 - Micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão para solução de PEG-8L puro na concentração de  $0,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Desta forma, pode-se observar que solução de PEG-8L livre apresenta agregados no seio da solução, em uma faixa ampla de distribuição de tamanhos, com predominância dos agregados menores. Se comparadas às micrografias dos lipossomas convencionais, observou-se que esses agregados não apresentaram bordas tão bem definidas.

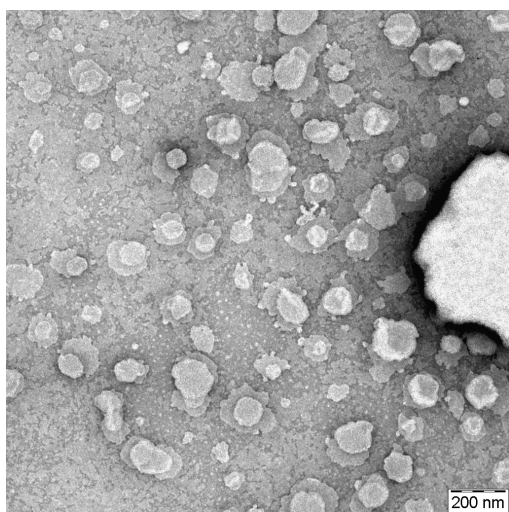
A Figura 24 apresenta micrografias referentes aos lipossomas elásticos, com 40 % de PEG-8-L ( $0,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ), incubados por 1 hora.



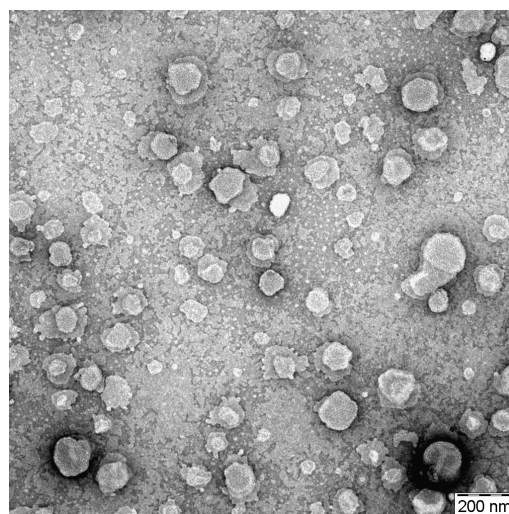
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 24 - Micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão para as dispersões de lipossomas contendo de 40% de PEG-8L após 1 hora de incubação.

Pelas características apresentadas (Figura 24a), a bicamada lipídica fica completamente envolvida pelo tensoativo, gerando os lipossomas elásticos. Essa

característica aparece em todos os campos da amostra, confirmando a incorporação do PEG-8L na superfície das vesículas e afastando a suspeita de sobreposição dos lipossomas sobre o PEG-8L.

No quadro vermelho destacaram-se os agregados de PEG-8L não incorporados na bicamada lipídica. Da Figura 24b, observaram-se vesículas elásticas com grande variedade de tamanhos, predominando as de pequeno tamanho.

#### 5.2.4 Tensão superficial

Para as proporções de PEG-8L (25% e 40 %) usadas na preparação dos lipossomas elásticos, acompanhou-se o comportamento da tensão superficial durante 60 segundos, em dois tempos de incubação: imediatamente após a adição de PEG-8L (aproximadamente 0,02 horas) e com 1 hora.

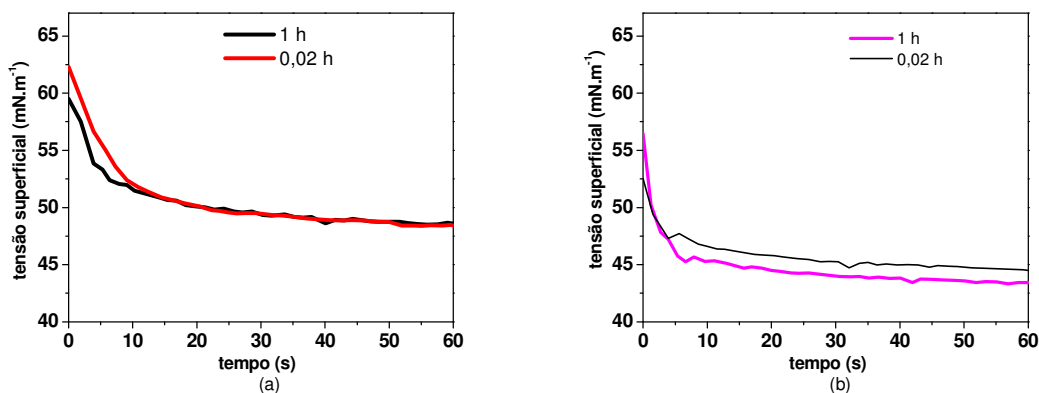


Figura 25 – Medidas de tensão superficial durante a incubação dos lipossomas convencionas de lecitina de ovo com PEG-8L nas proporções (a) 25 % (b) 40%.

Durante os primeiros 10 segundos aproximadamente, observou-se uma queda significativa da tensão superficial em ambas as Figuras: 25a e 25b. Provavelmente, este comportamento deve estar relacionado com processos difusivos no sistema, decorrentes da adição do PEG-8L.

A Figura 25a representa as medidas feitas durante a incubação de lipossomas convencionais com 25% de PEG-8L. A tensão superficial obtida foi de

aproximadamente  $51 \text{ mN.m}^{-1}$ , mostrando que, neste caso, a presença de 25% de PEG-8L não perturba significativamente a tensão superficial inicial do sistema, mesmo após 1 hora de incubação.

Para 40% de PEG-8L na presença de lipossomas, o tempo de incubação parece exercer diferença, conforme observado nos diferentes valores de tensão superficial de equilíbrio (Figura 25b). Após 1 hora de incubação, observou-se redução na tensão superficial em relação ao tempo de aproximadamente 0,02 horas. Esses resultados corroboram com os obtidos por Bouwstra *et al.* (1999), para a tensão superficial das dispersões de lipossomas contendo PEG-8L.

Os resultados de tensão superficial das dispersões de lipossomas após a incubação com PEG-8L, são coerentes com a distribuição de tamanhos obtida anteriormente, mostrando claramente a reorganização das vesículas com a incorporação do PEG-8L.

O comportamento da variação da tensão superficial para as diferentes concentrações de PEG-8L (25% e 40%), mostrou coerência com os valores de porcentagem de incorporação apresentados no item 5.2.1, onde mostra que a porcentagem de incorporação é menor para 40% PEG-8L na presença de lipossomas convencionais. Desta forma, há maior proporção de PEG-8L livre na dispersão coloidal, diminuindo a tensão superficial.

### **5.3 Transição de Formas dos Permeados**

A transição de formas das partículas contidas nas dispersões de lipossomas convencionais, PEG-8L e lipossomas elásticos preparados com 25% e 40% de PEG-8L, foi avaliada em termos de diâmetro médio e distribuição de tamanhos, morfologia e tensão superficial.

#### **5.3.1 Diâmetro Médio e Distribuição de Tamanhos**

As permeações dos lipossomas convencionais e elásticos (25% e 40% de PEG-8L) foram estudadas em função das pressões aplicadas na faixa de 2,5 a 20 atm. Adicionalmente, foram feitas permeações de solução de PEG-8L puro na

concentração  $0,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , correspondente à concentração utilizada na preparação dos lipossomas elásticos (40% de PEG-8L). Os resultados foram avaliados em termos do diâmetro médio e distribuição de tamanhos ao longo de 24 horas.

### 5.3.1.1 Lipossomas convencionais

A Figura 26 e Tabela 4 apresentam as transições de formas de lipossomas convencionais quando permeados através de membranas sintéticas sob pressões de 2,5; 5; 10; 12 e 20 atm. Esses lipossomas foram previamente homogeneizados através de extrusão em membranas de policarbonato de 100nm, conforme apresentado no item 4.2.2. As medidas foram expressas em termos de intensidade de luz espalhada e número predominante de partículas em função do diâmetro. A distribuição de tamanhos foi acompanhada durante 24 horas, visando avaliar a estabilidade dos lipossomas após a permeação.

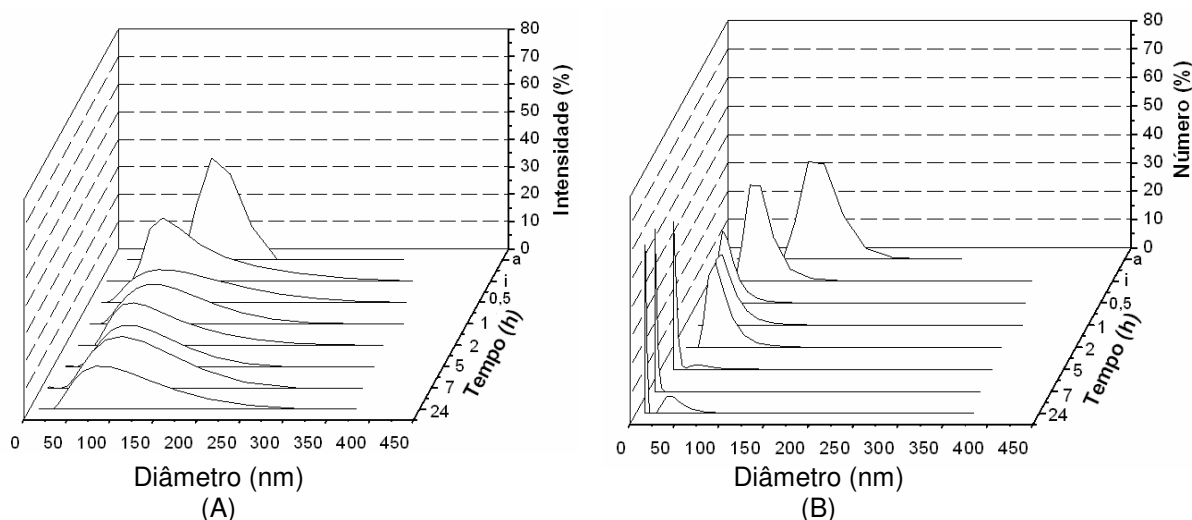


Figura 26 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos das vesículas lipídicas, após permeação em 2,5 atm e  $37^{\circ} \text{C}$ , durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação para os lipossomas convencionais

i – Distribuição para os lipossomas convencionais imediatamente após a permeação de toda a amostra.



A Tabela 4 resume os resultados obtidos das distribuições de tamanhos apresentadas na Figura 26.

Tabela 4 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas convencionais após permeação na pressão de 2,5 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	90 – 160 (100% - 103,4)	80 – 190 (100% - 104)
i	45,2 – 285,6 (99,5% - 95,2)	35,9 – 143,1 (100% - 54,7)
0,5	24,1 – 309,3 (100% - 98,2)	20,3 – 111,5 (100% - 34,2)
1	29,4 – 268,2 (99,4% - 97,6)	24,8 – 135,8 (100% - 44,2)
2	35 – 260 (100% - 93)	30 – 142 (100% - 46)
5	14,6 – 20,6; 34,3 – 222,7 (98,6% - 94,9)	14,6 – 95,1 (94% - 16,3; 6% - 46,7)
7	7,4 – 11,7; 29,4 – 234,1 (99,1% - 99,2)	7,4 – 14,8 (99,8% - 8,5)
24	27,9 – 308,7 (100% - 96,5)	10,3 – 12,5; 22,9 – 113,4 (79,3% - 10,8; 20,7% - 42,3)

a – Distribuição obtida antes da permeação para os lipossomas convencionais

i – Distribuição para os lipossomas convencionais imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Para os lipossomas convencionais, antes da permeação, a distribuição de tamanhos foi unimodal tanto em termos de intensidade de luz espalhada quanto em número de vesículas na amostra, apresentando diâmetro médio de aproximadamente 100 nm em ambos os casos.

Imediatamente após a permeação da amostra, na pressão de 2,5 atm, a faixa de distribuição de tamanhos dos lipossomas convencionais, em termos de intensidade de luz espalhada, aumentou significativamente, apresentando diâmetro médio de aproximadamente 90 nm. Este comportamento foi observado ao longo das 24 horas. Em termos de número, observou-se uma redução do diâmetro médio das vesículas elásticas ao longo do tempo.

Para pressão de 5 atm (Figura 27), em termos de intensidade de luz espalhada, o comportamento das vesículas foi bastante estável, apresentando-se semelhante ao comportamento observado em 2,5 atm. Em termos de número, o diâmetro oscilou nas primeiras 7 horas apresentando, entretanto, valor semelhante ao observado em termos de intensidade no tempo de 24 horas.

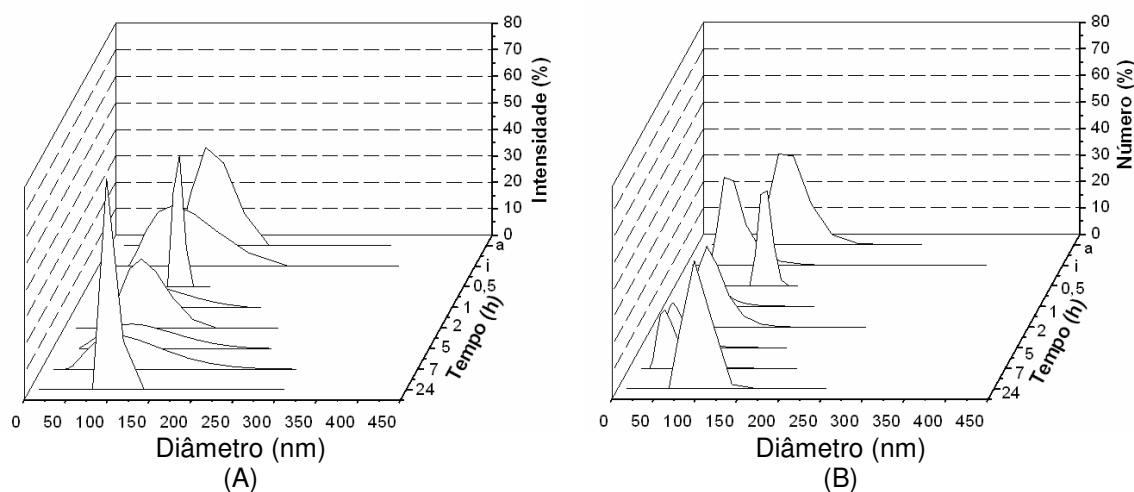


Figura 27 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos das vesículas lipídicas, após permeação em 5 atm e 37<sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação para os lipossomas convencionais

i – Distribuição para os lipossomas imediatamente após a permeação de toda a amostra.

A Tabela 5 resume os resultados obtidos das distribuições de tamanhos na Figura 27.

Tabela 5 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas convencionais após permeação na pressão de 5 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	90 – 160 (100% - 103,4)	80 – 190 (100% - 104)
i	45,1 – 226,3 (100% - 95,5)	35,8 – 142,7 (100% - 55,4)
0,5	103 – 118,5 (100% - 109)	96,0 – 127,1 (100% - 107,8)
1	44,3 – 221,8 (100% - 95,7)	44,3 – 145,7 (100% - 60,1)
2	55,3 – 153,6 (100% - 94,3)	46,7 – 156,6 (100% - 70,8)
5	31,9 – 236,1 (100% - 97,3)	31,9 – 129,5 (100% - 45,8)
7	32,5 – 265,5 (100% - 97,1)	28,3 – 131,9 (100% - 47,4)
24	91,5 – 111,7 (100% - 95,2)	74,9 – 136,5 (100% - 93,7)

a – Distribuição obtida antes da permeação para os lipossomas convencionais

i – Distribuição para os lipossomas convencionais imediatamente após a permeação de toda a amostra.

As Figuras 28, 29 e 30 apresentam o comportamento para pressões mais elevadas (12, 18 e 20 atm) e as Tabelas 6, 7 e 8 apresentam os resultados de forma resumida.

Na pressão de 12 atm, em termos de intensidade de luz espalhada, o diâmetro médio das vesículas apresentou-se na faixa de aproximadamente 75 nm, ao longo de 24 horas (Figura 28a). Em termos de número (Figura 28b), 98,8% das vesículas apresentaram diâmetro médio de 77 nm imediatamente após a permeação, sugerindo ruptura das vesículas. Nos tempos de 0,5 até 7 horas, observou-se que o diâmetro médio manteve-se estável, em torno de 50 nm. Este comportamento deve-se a uma possível reestruturação dos lipídios na reorganização das vesículas. Em 24 horas, as vesículas apresentaram comportamento semelhante ao apresentado imediatamente após a permeação.

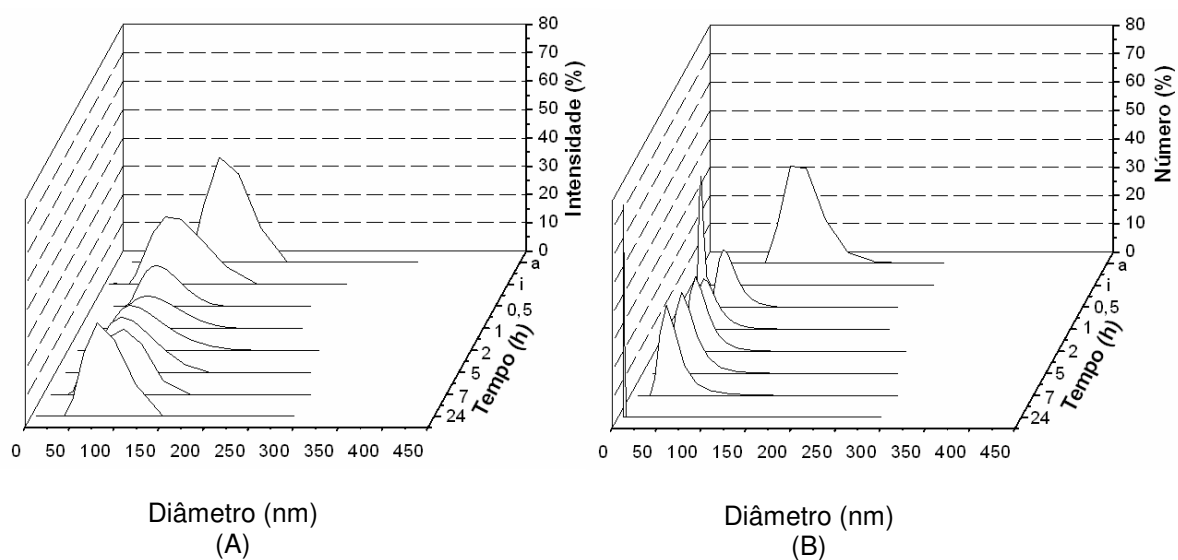


Figura 28 – Influência do tempo no médio e distribuição de tamanhos das vesículas lipídicas, após permeação em 12 atm e 37<sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação para os lipossomas convencionais

i – Distribuição para os lipossomas imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 6 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas convencionais após serem permeados na pressão de 12 atm e 37<sup>o</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	90 – 160 (100% - 103,4)	80 – 190 (100% - 104)
i	8,6; 27,1 – 171,4 (99,9% - 76,5)	5,4 – 13,6; 27,1 – 68,2 (98,8% - 7,7; 1,2% - 40,9)
0,5	40,2 – 147,8 (100% - 75)	36,4 – 121 (100% - 54,6)
1	33,5 – 166,2 (100% - 78,2)	27,4 – 123,1 (100% - 47,4)
2	34,4 – 184,4 (100% - 78,9)	29,9 – 121,2 (100% - 50,1)
5	37 – 144,4 (100% - 78,1)	31,2 – 121,8 (100% - 48,7)
7	33,1 – 134,2 (100% - 79,2)	27,1 – 134,2 (100% - 44,8)
24	5,9; 46,6 – 117 (99,7% - 78,7)	5,9 – 7,4 (100% - 6,2)

a – Distribuição obtida antes da permeação para os lipossomas convencionais

i – Distribuição para os lipossomas convencionais imediatamente após a permeação de toda a amostra.

A Figura 29 e a Tabela 7 apresentam a distribuição de tamanhos para pressão de 18 atm. Os valores, tanto em termos de intensidade quanto em termos de número, foram semelhantes aos apresentados na pressão de 12 atm, com

exceção do valor no tempo de 24 horas, em termos de número, mostrando que a dispersão permaneceu estável.

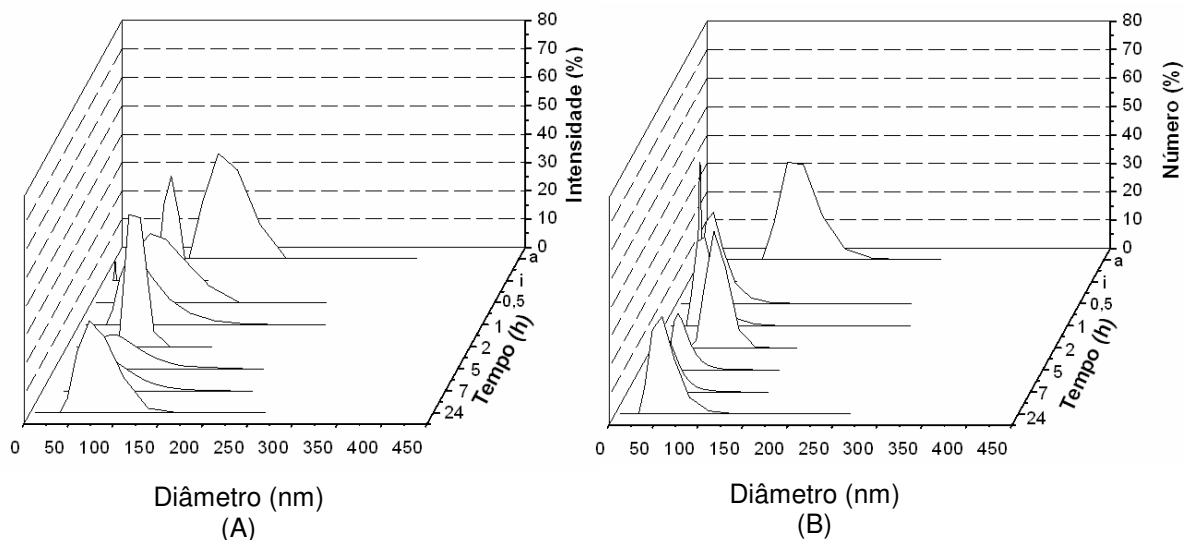


Figura 29 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos das vesículas lipídicas, após permeação em 18 atm e 37<sup>o</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação para os lipossomas convencionais

i – Distribuição para os lipossomas imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 7 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas convencionais após serem permeados na pressão de 18 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	90 – 160 (100% - 103,4)	80 – 190 (100% - 104)
i	11,6 – 13; 60,4 – 93,7 (8,5% - 12,7; 91,5% - 74,7)	10,4 – 14,5 (100% - 12,6)
0,5	33 – 131,4 (100% - 73,3)	26,2 – 131,4 (100% - 42,6)
1	37,2 – 151,1 (100% - 74,9)	30,4 – 123,7 (100% - 46,1)
2	58,5 – 97,4 (100% - 76,4)	49,3 – 115,5 (100% - 72,1)
5	34,9 – 233,8 (100% - 73,8)	31,6 – 116 (100% - 47,4)
7	35 – 234,4 (100% - 74,1)	31,7 – 116,3 (100% - 48,3)
24	41,6 – 131,6 (100% - 72,2)	33 – 131,6 (100% - 52,3)

a – Distribuição obtida antes da permeação para os lipossomas convencionais

i – Distribuição para os lipossomas convencionais imediatamente após a permeação de toda a amostra.

A análise de distribuição de tamanhos e diâmetro médio na permeação a 20 atm, apresentada na Figura 30 e Tabela 8, novamente apresentam o mesmo comportamento observado nas pressões de 12 e 18 atm, em termos de

intensidade de luz espalhada, aproximadamente 75 nm. Contudo, em termos de número, observou-se que não houve ruptura das vesículas convencionais durante a permeação.

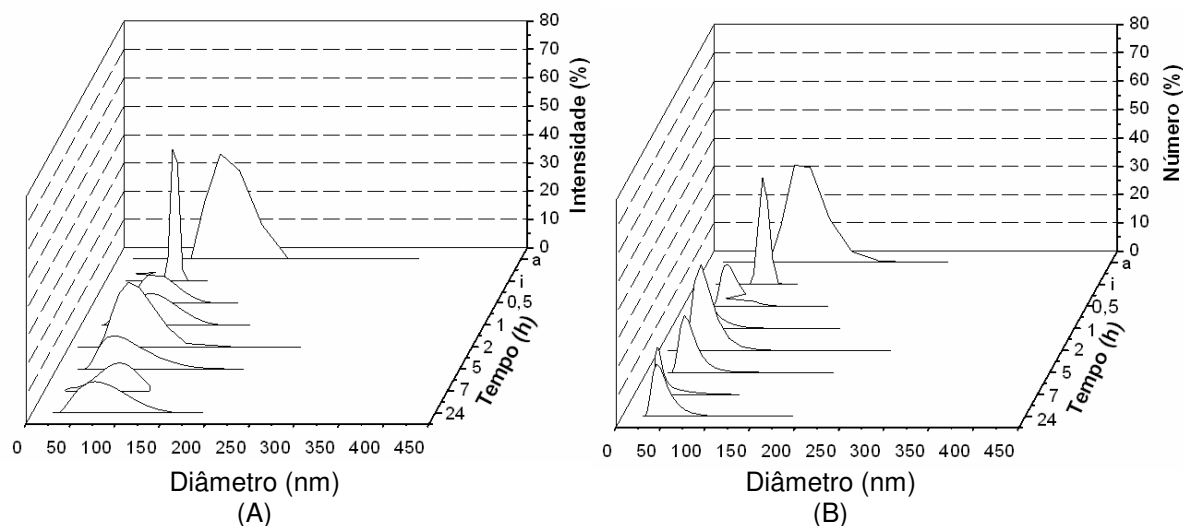


Figura 30 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos das vesículas lipídicas, após permeação em 20 atm e 37<sup>o</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação para os lipossomas convencionais

i – Distribuição para os lipossomas imediatamente após a permeação de toda a amostra.



Tabela 8 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas convencionais após serem permeados na pressão de 20 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	90 – 160 (100% - 103,4)	80 – 190 (100% - 104)
i	69,7 – 86 (100% - 77)	65 – 92,3 (100% - 76,1)
0,5	37,1 – 130,8 (100% - 71,4)	34,6 – 106 (100% - 53,2)
1	28,1 – 139,5 (100% - 72,8)	25,4 – 103,3 (100% - 38,6)
2	39,8 – 131 (100% - 71,7)	33,6 – 110,5 (100% - 50,3)
5	34,4 – 170,9 (100% - 72,9)	31,2 – 114,5 (100% - 47,3)
7	23,5 – 117,5 (100% - 74)	23,5 – 102,2 (100% - 32)
24	31,4 – 156 (100% - 73,6)	28,4 – 115,5 (100% - 44,3)

a – Distribuição obtida antes da permeação para os lipossomas convencionais

i – Distribuição para os lipossomas convencionais imediatamente após a permeação de toda a amostra.

A análise dos resultados mostra que a permeação a baixas pressões (2,5 e 5 atm) produziu alargamento da distribuição de tamanhos das vesículas em relação à condição inicial, com predominância de diâmetro médio da ordem de 50nm. Para as pressões mais altas (12, 18 e 20 atm), as distribuições resultantes

foram mais estreitas que a baixas pressões, com predominância de diâmetro médio da ordem de 70nm, em termos de intensidade, e 40 nm, em termos de número. Ao longo de 24 horas, as distribuições apresentaram um equilíbrio dinâmico entre os menores e maiores diâmetros, sempre com tendência a uma distribuição mais estreita comparada à inicial, em toda a faixa de pressões estudada. Embora com somente uma passagem através das membranas, o comportamento apresentado pelas vesículas convencionais é característico de extrusão, com ruptura ou desestruturação das vesículas (Friskén *et al.*, 2000).

### 5.3.1.2 Solução de PEG-8L puro

Conforme descrito no item 4.2.8, foram feitas permeações de PEG-8L para melhor entender o comportamento deste, quando puro em solução, para que posteriormente, após a incorporação e permeação dos lipossomas elásticos, se possa entender sua reologia e transição de formas. A Figura 31 e Tabela 9 apresentam a distribuição de tamanhos para o PEG-8L antes de permeado e seu comportamento ao longo do tempo, após a permeação a 2,5 atm.

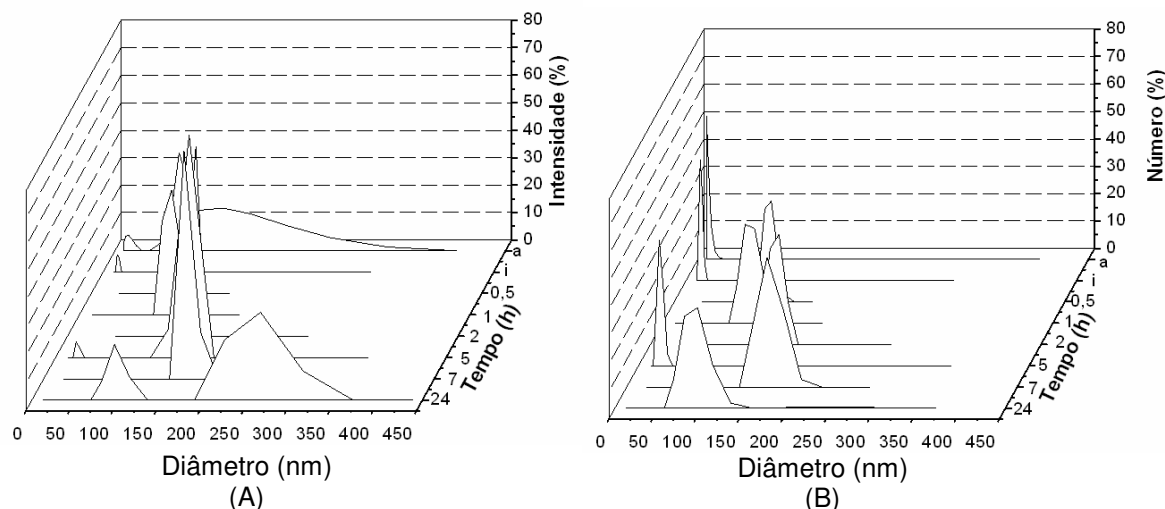


Figura 31 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos da solução de PEG-8L puro, na concentração de  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , após permeação em 2,5 atm e  $37^{\circ} \text{ C}$ , durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação para a solução de PEG-8L puro.

i – Distribuição para a solução de PEG-8L puro imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 9 - Distribuições de tamanhos para a solução de PEG-8L puro, após permeação na pressão de 2,5 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	9,9 – 24,8; 49,6 – 312,9 (19,3% - 15,7; 79,1% - 130,7)	9,9 – 24,8 (100% - 11,8)
i	16,3 – 18,8; 76 – 100,5 (11,4% - 17,3; 88,6 – 89,8)	14,2 – 21,6 (100% - 17)
0,5	104,4 – 120,1 (100% - 110,7)	97,4 – 128,8 (100% - 109,5)
1	95,4 – 118,8 (100% - 105,2)	85,5 – 132,6 (100% - 102)
2	138 – 148 (100% - 144,9)	128,7 – 158,7 (100% - 144,2)
5	23,7 – 28,1; 129,7 – 153,8 (8,8% - 25,2; 91,2% - 151,1)	20 – 33,3 (100% - 24,6)
7	161,7 – 180,5 (100% - 164,9)	144,9 – 201,4 (100% - 164,2)
24	80,1 – 112,6; 222,3 – 312,4 (35,3% - 96,3; 64,7% - 257,5)	67,6 – 312,4 (98,6% - 90,5; 1,4% - 251)

a – Distribuição obtida antes da permeação para a solução de PEG-8L puro.

i – Distribuição para a solução de PEG-8L puro imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Assim, por intermédio dos valores apresentados pela Tabela 9, verificou-se que não existe variação da distribuição de tamanhos imediatamente após a permeação, em termos de intensidade. No entanto, ao longo do tempo, verificou-

se aumento do diâmetro médio, até 164,9 nm em 7 horas, mostrando assim a agregação das micelas. Em 24 horas, existe uma reestruturação do agregado, dividindo-se em duas populações. Para as análises em termos de número, observou-se oscilação dos valores de diâmetro médio, mostrando um mecanismo dinâmico de agregação e desagregação das micelas.

A Figura 32 e Tabela 10 apresentam dados de permeação na pressão de 5 atm.

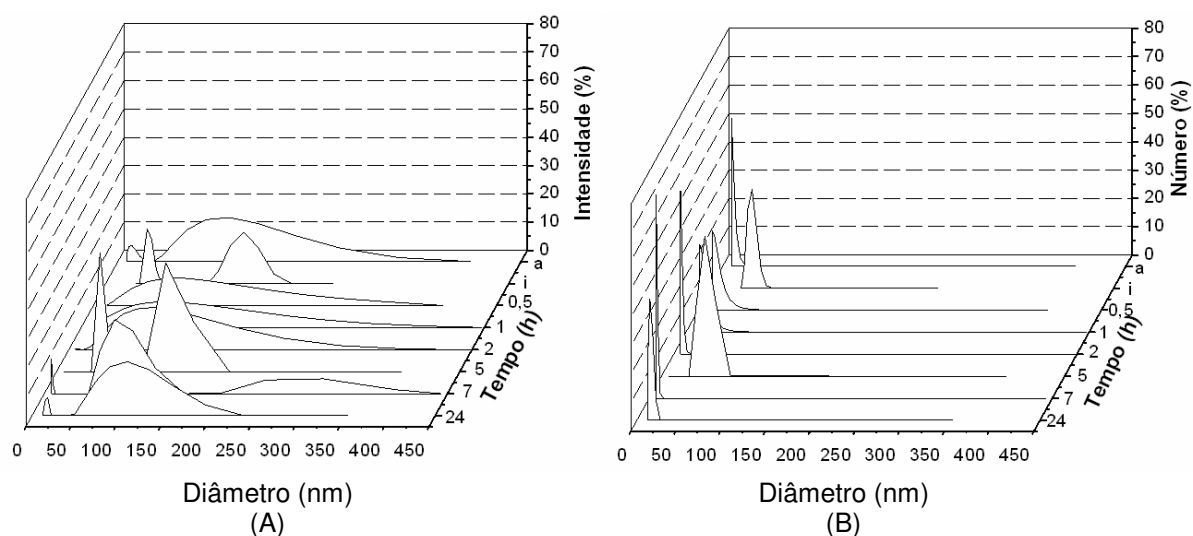


Figura 32 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos da solução de PEG-8-L puro, na concentração de  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , em 5,0 atm e  $37^{\circ} \text{ C}$ , durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação para a solução de PEG-8L puro.

i – Distribuição para a solução de PEG-8L puro imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 10 - Distribuições de tamanhos para a solução de PEG-8L puro, após permeação na pressão de 5 atm e 37° C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	9,9 – 24,8; 49,6 – 312,9 (19,3% - 15,7; 79,1% - 130,7)	9,9 – 24,8 (100% - 11,8)
i	41,9 – 56,5; 126 – 188 (48,1% - 48,1; 51,9% - 154)	37,9 – 62,5 (99,9% - 46,2)
0,5	15,4 – 389,8 (100% - 106,2)	15,4 – 84,3 (100% - 21,4)
1	15,2 – 384,7 (100% - 104,6)	15,2 – 70,2 (100% - 20,4)
2	7,6 – 380,8 (99,1% - 103)	7,6 – 38 (99,3% - 8,7)
5	48,4 – 61; 121,7 – 153,2 (44,2% - 49,1; 55,8% - 131,5)	38,5 – 153,2 (99,5% - 49,3)
7	7,8 – 9,8; 62,1 – 392,1 (15,8% - 8,3; 72,6% - 86,7; 11,5% - 293,5)	7,8 – 12,4 (100% - 8,4)
24	14,3 – 17,5; 47,6 – 193,2 (11,5% - 16,1; 85,3% – 108,3)	11,7 – 21,4 (100% - 15,3)

a – Distribuição obtida antes da permeação para a solução de PEG-8L puro.

i – Distribuição para a solução de PEG-8L puro imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Para a pressão de 5 atm, continuou-se observando o mecanismo dinâmico de agregação e desagregação das micelas. Entretanto, deve-se ressaltar aumento

na distribuição de tamanhos, em termos de intensidade, e diminuição do diâmetro médio, em termos de número.

À pressão de 12 atm, observou-se que, para ambos os casos (intensidade e número), o comportamento manteve-se uniforme ao longo de 24 horas. Em termos de intensidade, houve presença de micelas (aproximadamente 25 nm) e agregados (aproximadamente 200 nm), o que sugere a presença de estruturas na forma de esferas ou esfero-cilindros. Na análise por número, predominaram as micelas com diâmetro médio de aproximadamente 20 nm, ao longo das 24 horas.

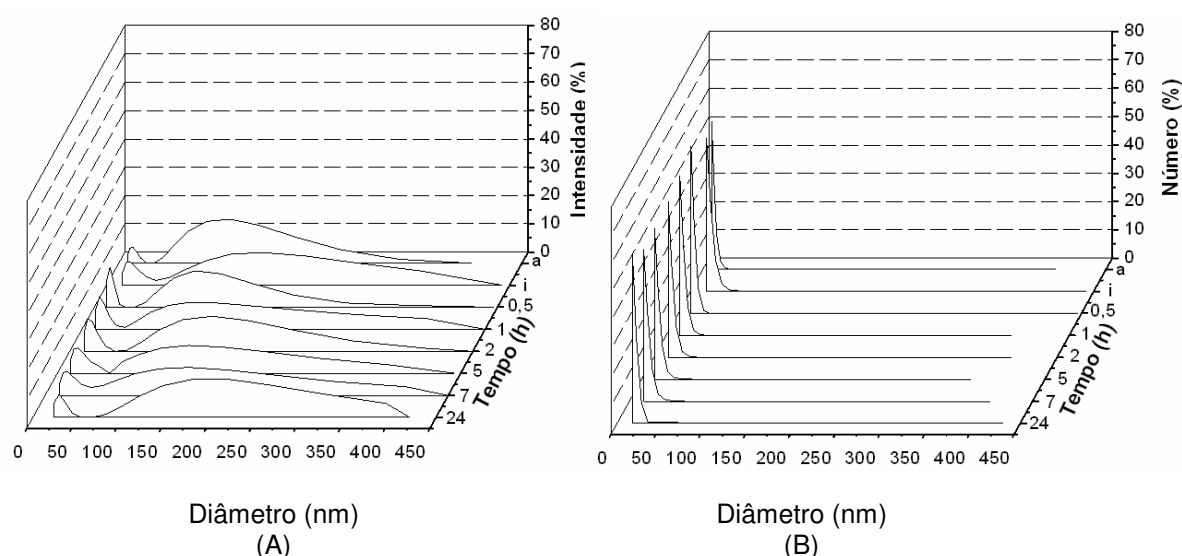


Figura 33 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos da solução de PEG-8-L puro, na concentração de  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , em 12 atm e  $37^{\circ} \text{ C}$ , durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação para a solução de PEG-8L puro

i – Distribuição para a solução de PEG-8L puro imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 11 - Distribuições de tamanhos para a solução de PEG-8L puro, após permeação na pressão de 12 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	9,9 – 24,8; 49,6 – 312,9 (19,3% - 15,7; 79,1% - 130,7)	9,9 – 24,8 (100% - 11,8)
i	17,6 – 441,7 (29,8% - 29,4; 67,7% - 205,1)	17,6 – 55,6 (100% - 20,8)
0,5	14,1 – 28,1; 56 – 445,4 (32,7% - 18,1; 56,4% - 133,5)	14,1 – 28,1 (100% - 16,1)
1	15,3 – 385,4 (33,8% - 22,7; 64,1% - 199,2)	15,3 – 38,5 (100% - 17,8)
2	15,9 – 39,9; 63,2 – 399,2 (36,3% - 23,7; 57,4% - 173,3)	15,9 – 39,9 (100% - 18,6)
5	14,6 – 368 (34,4% - 25,3; 61,3% 182,8)	14,6 – 46,3 (100% - 17,4)
7	16 – 402,5 (32,6% - 27,9; 63,5% - 191,7)	16 – 50,6 (100% - 19)
24	23,9 – 43,6; 79,5 – 394,3 (20,4% - 30,6; 77,3% - 222,7)	23,9 – 53,2 (100% - 27,2)

a – Distribuição obtida antes da permeação para a solução de PEG-8L puro.

i – Distribuição para a solução de PEG-8L puro imediatamente após a permeação de toda a amostra.

A estabilidade observada na pressão de 12 atm provavelmente deve-se ao valor mínimo de energia livre alcançado pelo sistema nessas condições. As micelas de PEG-8L puro em solução, diferentemente das vesículas lipídicas,

quando permeadas em pressões intermediárias (12 atm) não sofrem alterações em seu formato.

Para a pressão de 18 atm (Figura 34 e Tabela 12), os valores apresentados mostram comportamento semelhante ao observado a baixas pressões (2,5 e 5 atm), tanto com relação ao diâmetro médio como com relação à distribuição de tamanhos.

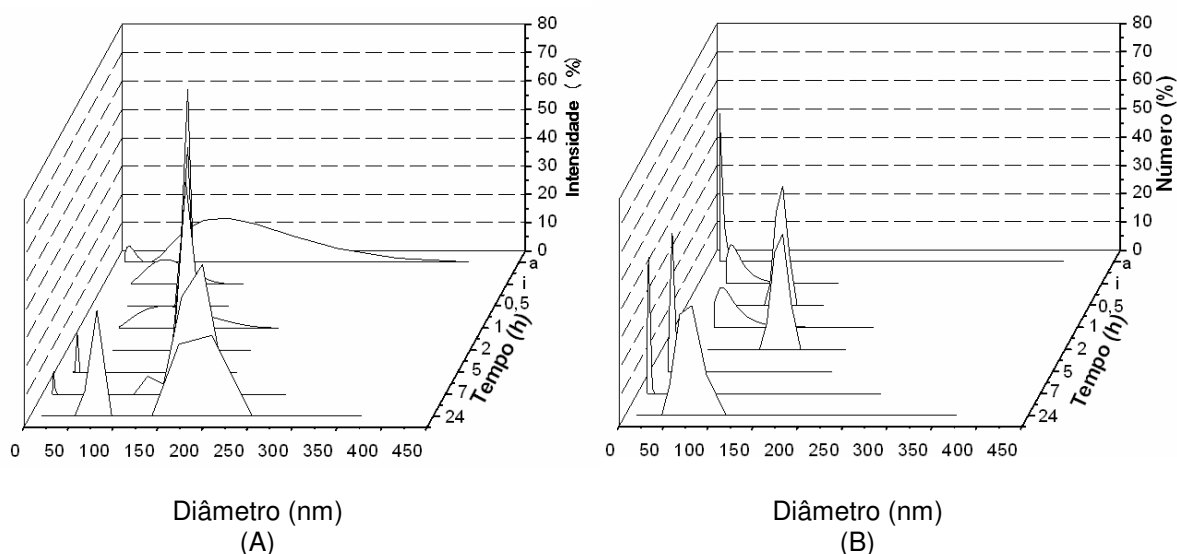


Figura 34 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos da solução de PEG-8-L puro em solução, na concentração de  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , em 18 atm e  $37^{\circ} \text{ C}$ , durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação para a solução de PEG-8L puro

i – Distribuição para a solução de PEG-8L puro imediatamente após a permeação de toda a amostra.



Tabela 12 - Distribuições de tamanhos para a solução de PEG-8L puro, após permeação na pressão de 18 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	9,9 – 24,8; 49,6 – 312,9 (19,3% - 15,7; 79,1% - 130,7)	9,9 – 24,8 (100% - 11,8)
i	31,1 – 135 (100% - 68,5)	31,1 – 102,1 (100% - 43,1)
0,5	100,1 – 107,4 (100% - 105,7)	93,4 – 115,2 (100% - 105,3)
1	44,6 – 207,9 (100% - 99,7)	44,6 – 146,5 (100% - 61,5)
2	125,6 – 134,8 (100% - 132,2)	117,2 – 144,5 (100% - 131,6)
5	22,6 – 25,2; 146,2 – 163,2 (14,1% - 25,2; 85,9% - 149,9)	20,3 – 28,2 (100% - 25,2)
7	12,5 – 14,4; 117,5 – 178,9 (9,6% - 12,8; 9,7% - 124; 80,7% - 167,4)	10,9 – 16,6 (100% - 12,7)
24	61 – 74,5; 166,1 – 202,9 (46,1% - 71,9; 53,9% - 185,5)	49,9 – 91,1; 135,9 – 202,9 (99,4% - 69,3)

a – Distribuição obtida antes da permeação para a solução de PEG-8L puro.

i – Distribuição para a solução de PEG-8L puro imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Em 20 atm (Figura 35 e Tabela 13), deve-se ressaltar que, embora o comportamento das micelas seja semelhante às pressões de 2,5; 5 e 18 atm, houve aumento de tamanho de aproximadamente 20 nm para 150 nm, em termos de número.

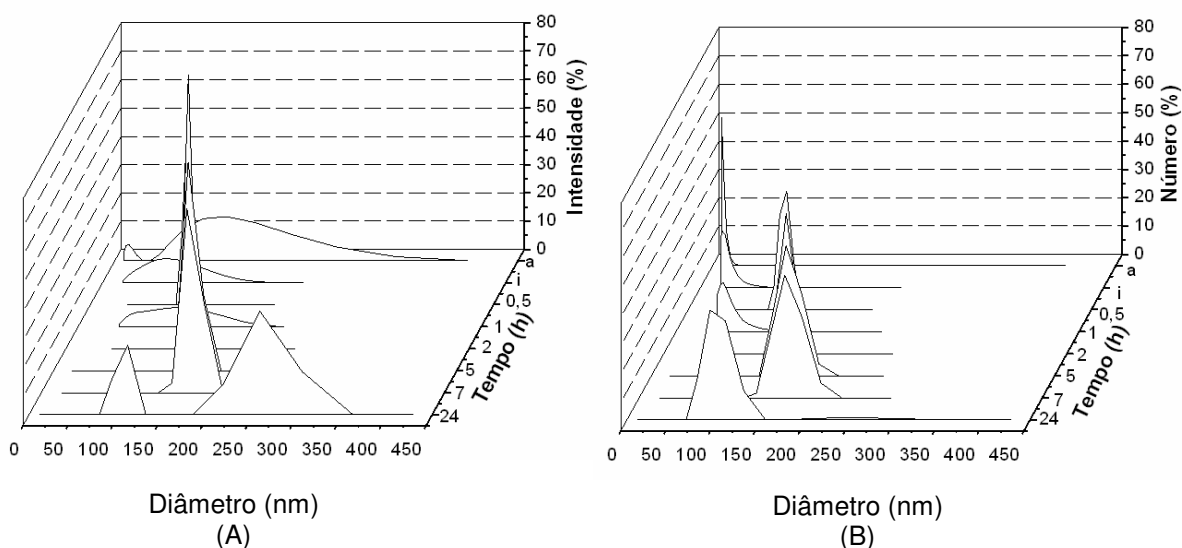


Figura 35 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos da solução de PEG-8-L puro em solução, na concentração de  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , em 20 atm e  $37^{\circ} \text{ C}$ , durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação para a solução de PEG-8L puro.

i – Distribuição para a solução de PEG-8L puro imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 13 - Distribuições de tamanhos para a solução de PEG-8L puro, após permeação na pressão de 20 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	9,9 – 24,8; 49,6 – 312,9 (19,3% - 15,7; 79,1% - 130,7)	9,9 – 24,8 (100% - 11,8)
i	22,4 – 183,5 (100% - 70,3)	22,4 – 91,1 (100% - 30,2)
0,5	102,4 – 109,8 (100% - 108)	95,5 – 117,8 (100% - 107,5)
1	46 – 214,3 (100% - 102,5)	46 – 151 (100% - 59,4)
2	136,6 – 146,5 (100% - 136,9)	127,4 – 157,1 (100% - 137)
5	150 – 167,4 (100% - 154,6)	134,4 – 186,9 (100% - 153,4)
7	145,7 – 181,5 (100% - 168,1)	130,6 – 202,6 (100% - 165,9)
24	92,8 – 305,1 (37,5% - 104,1; 62,5% - 262)	78,2 – 130,3; 217,1 – 305,1 (98% - 100,7; 2% - 256,1)

a – Distribuição obtida antes da permeação para a solução de PEG-8L puro.

i – Distribuição para a solução de PEG-8L puro imediatamente após a permeação de toda a amostra.

### 5.3.1.3 Lipossomas elásticos na proporção 75:25

A permeação das vesículas contendo 25 % de PEG-8L incorporado, conforme descrito no item 4.2.8, apresentou os resultados mostrados nas Figuras 36 a 40 e Tabelas 14 a 18. A Figura 36 apresenta dados relacionados à pressão de 2,5 atm.

Inicialmente, apresentou-se distribuição de tamanhos para os lipossomas elásticos antes da permeação para que, posteriormente, se possa avaliar a transição de formas das vesículas. Os lipossomas elásticos formados a partir da incubação com 25 % de PEG-8L, antes de serem permeados, apresentaram duas populações, com distribuição de tamanhos entre 5,3 e 8,4 nm para a primeira, e entre 21,2 a 168,6 nm, para a segunda, com média de 71,9 nm para a totalidade das partículas, em termos de intensidade de luz espalhada.

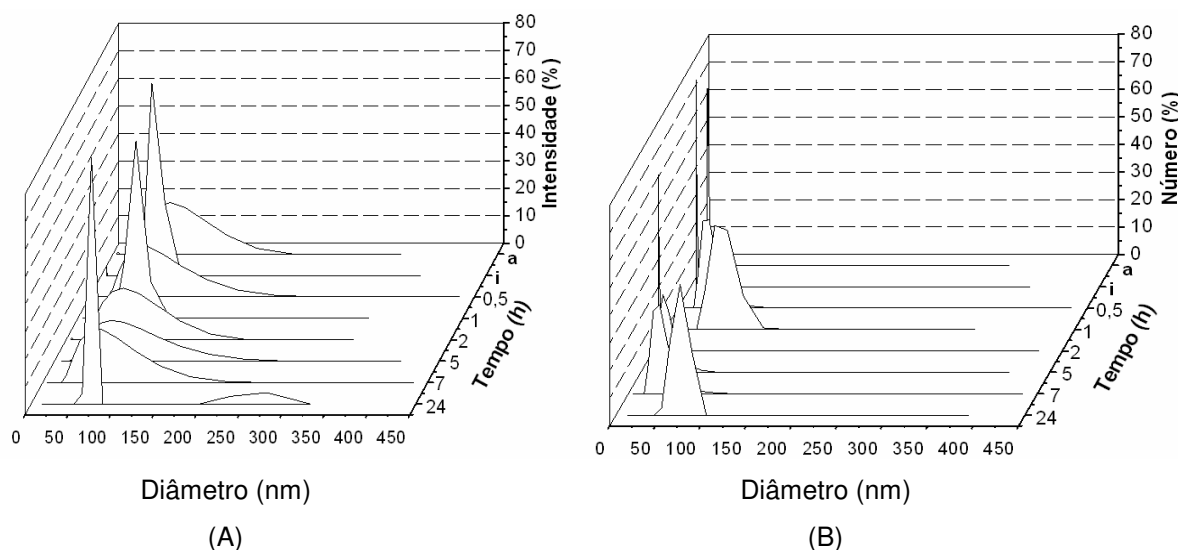


Figura 36 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L), após permeação em 2,5 atm e 37<sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L).

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 14 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) após permeação na pressão de 2,5 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	5,3 – 8,4 e 21,2 - 168,6 (99,0% - 71,9)	5,3 – 10,6 (9,0% - 5,9)
i	5,9 e 59,2 – 74,5 (3,5% - 5,9) e (96,2% - 63,4)	5,9 – 7,4 (100% - 6,3)
0,5	27,3 – 216,7 (100% - 72,7)	21,6 – 108,6 (100% - 34,1)
1	53,9 – 85,5 (97,6% - 67,5)	42,8 – 107,7 (100% - 61,7)
2	5,3 – 8,4 e 21,2 – 168,6 (99% - 71,9)	5,3 – 10,6 (100% - 5,9)
5	20,1 – 221,9 (99,3% - 76,5)	16,4 – 99,6 (100% - 28,4)
7	27,3 – 217,2 (100% - 72,4)	21,7 – 108,8 (100% - 34,9)
24	59,7 – 70,7 e 232,7 – 275,8 (93,1% - 70,3) e (6,9% - 258,6)	50,3 – 83,9 (100% - 70,1)

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L).

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Em termos de número, a distribuição de tamanhos variou entre 5,3 a 10,6 nm, com média 5,9 para 99,9 % das partículas.

Uma vez que os lipossomas convencionais possuem diâmetro médio de 108nm, explica-se a predominância de tamanhos da ordem de 5,3 a 10,6 nm na dispersão de lipossomas elásticos, pela presença das micelas de PEG-8L não incorporado na solução. Como pode ser visto na Tabela 14, a distribuição de tamanhos das micelas de PEG-8L encontra-se na faixa entre 9,9 e 24,8 nm, com média em 11,8 nm, em termos de número, que corresponde à mesma ordem de grandeza da distribuição dos pequenos tamanhos observada.

Imediatamente após a permeação de toda a amostra, em termos de intensidade de luz espalhada, as vesículas continuaram distribuídas em duas populações, com diâmetros 5,9 nm para a primeira e para a segunda, faixa mais estreita (59,2 a 74,5 nm), comparada a faixa de tamanhos da segunda população antes da permeação (aproximadamente 21,2 a 168,6 nm). Na análise por número, a distribuição de tamanhos variou entre 5,9 a 7,4 nm, com média 6,3 nm correspondente à presença predominante das micelas de PEG-8L anteriormente explicada, embora em termos de intensidade, observou-se a predominância de partículas com diâmetro médio de 63,4 nm.

Durante o intervalo de tempo de 0,5 até 7 horas, observou-se largas distribuições em termos de intensidade, e semelhantes entre si, apresentando diâmetro médio em torno de 70 nm. Em termos de número, o diâmetro médio oscilou neste intervalo de tempo apresentando, entretanto, em 24 horas, diâmetro médio semelhante ao observado em termos de diâmetro interno (aproximadamente 70 nm). Esses resultados indicam agregação das micelas de PEG-8L e/ou redistribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos, sugerindo instabilidades ao longo do tempo após a permeação.

A Figura 37 e a Tabela 15 apresentaram dados de permeação para pressão de 5 atm, não se observando alterações significativas na distribuição de tamanho e diâmetro médio das vesículas, tanto em termos de intensidade de luz espalhada (aproximadamente 109 nm) quanto em número (aproximadamente 50 nm).

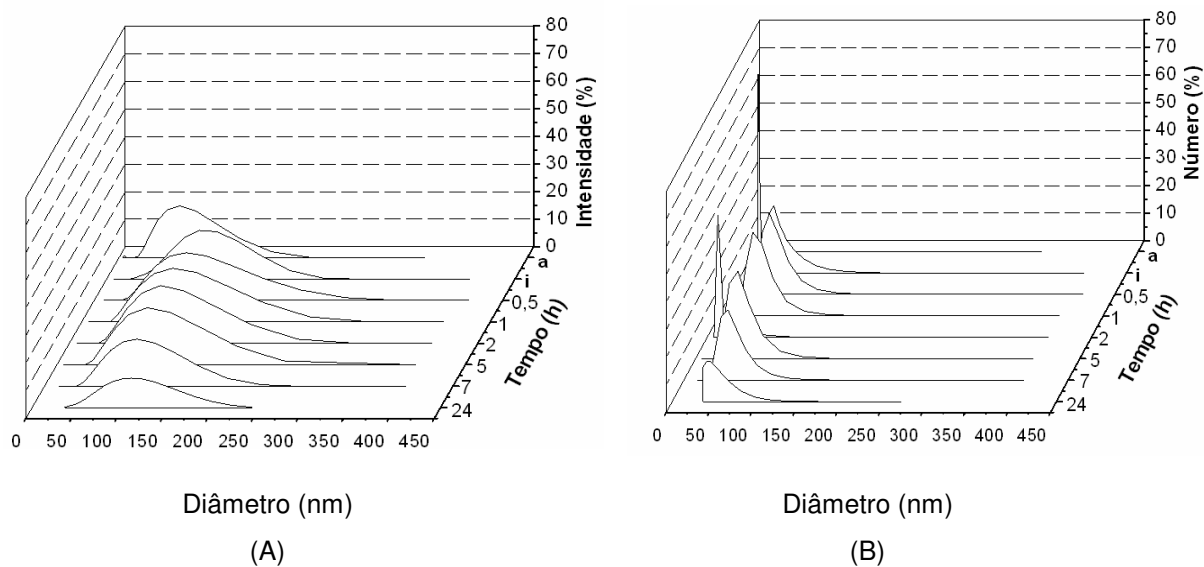


Figura 37 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L), após permeação em 5 atm e 37<sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L)

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 15 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) após permeação na pressão de 5 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	5,3 – 8,4 e 21,2 - 168,6 (99,0% - 71,9)	5,3 – 10,6 (9,0% - 5,9)
i	31,2 – 240,3 (100% - 108)	26,3 – 144,2 (100% - 44,4)
0,5	37,4 – 226,7 (100% - 111,3)	30,6 – 151,9 (100% - 51,2)
1	31,6 – 251,5 (100% - 108,4)	25,1 – 158,6 (100% - 47,3)
2	12,6 e 39,9 – 252,2 (99,9% - 109,9)	10 – 100,4 (94,9% - 13,2) e (5,1% - 53,6)
5	39,5 – 249,4 (100% - 108,6)	31,4 – 157,3 (100% - 52,5)
7	36,8 – 238,9 (100% - 105,2)	31 – 170 (100% - 55,7)
24	36,2 – 242,3 (100% - 109,9)	36,2 – 162,3 (100% - 54,2)

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L).

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

O diâmetro médio, em termos de intensidade foi semelhante ao valor dos lipossomas convencionais. Como não ocorreu a formação de duas populações, conforme observado para a solução de PEG-8L puro na Figura 32 e na Tabela 10, pode-se inferir que houve incorporação do tensoativo nas vesículas, resultando



em uma maior elasticidade e estabilidade, uma vez que este comportamento constante manteve-se ao longo das 24 horas.

Resultados a pressões de permeação mais elevadas (12, 18 e 20 atm) são apresentados através das Figuras 38, 39 e 40 e Tabelas 16, 17 e 18.

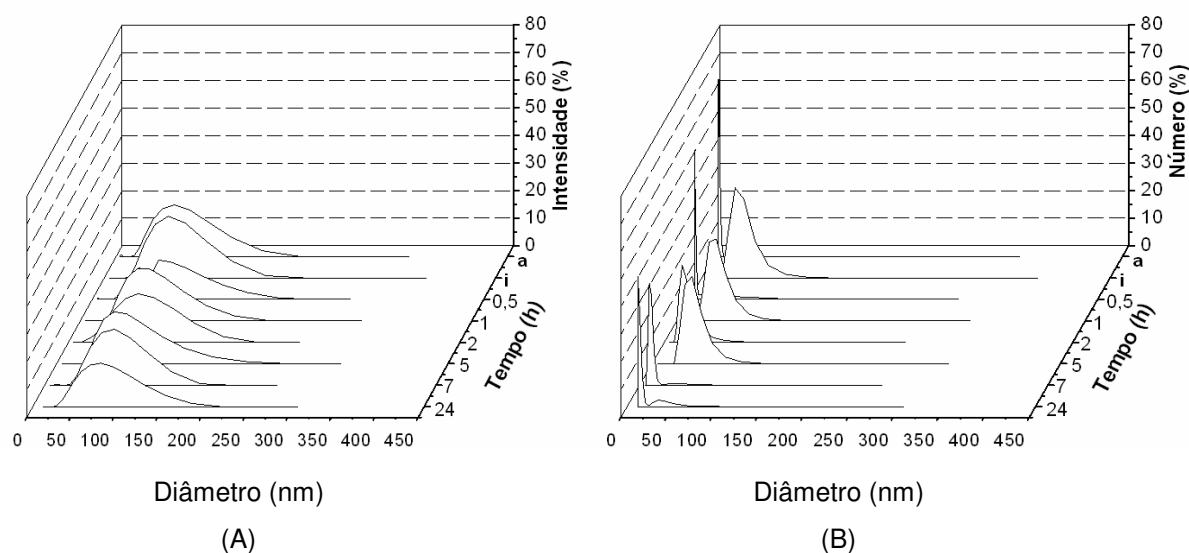


Figura 38 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L), após permeação em 12 atm e 37<sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L)

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 16 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) após permeação na pressão de 12 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	5,3 – 8,4 e 21,2 - 168,6 (99,0% - 71,9)	5,3 – 10,6 (9,0% - 5,9)
i	29,4 – 185,8 (100% - 80,3)	23,4 – 117,2 (100% - 43,7)
0,5	6 – 8,4 e 27,5 – 211,8 (99,2% - 82,8)	6 – 9,9 (100% - 6,7)
1	29,2 – 216,4 (100% - 80,3)	23,9 – 118,7 (100% - 44,2)
2	16,1 – 178,3 (100% - 81,4)	13,2 – 97,8 (100% - 24,3)
5	36,2 – 219,2 (100% - 82)	29,6 – 120,2 (100% - 45,4)
7	10,8 – 16,2 e 29,5 – 178,8 (99,4% - 80,4)	8,9 – 80,3 (97,4% - 12,2) e (2,6% - 43,6)
24	12 – 16,9 e 28,1 – 182,7 (99,6% - 81,1)	12 – 92,5 (90,6% - 13,6) e (9,4% - 40)

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L).

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Para a pressão de 12 atm, valores de diâmetro médio, em termos de intensidade, não apresentaram alterações significativas, ao longo do tempo. Porém, em termos de número, observou-se oscilação do diâmetro médio no intervalo imediatamente após a permeação até 5 horas, o que sugere uma

reestruturação do sistema até atingir o equilíbrio, predominando diâmetro médio de 12 nm.

Assim, para a pressão de 12 atm, observou-se após 7 horas presença de micelas e vesículas elásticas. Em termos de intensidade, houve predominância de vesículas maiores (aproximadamente 80 nm), enquanto em termos de número houve predominância de micelas, observando-se, em menor proporção, presença de vesículas da ordem de 40 nm.

A Figura 39 e a Tabela 17 apresentam dados de permeação na pressão 18 atm, cujo comportamento se assemelha ao observado na pressão de 5 atm.

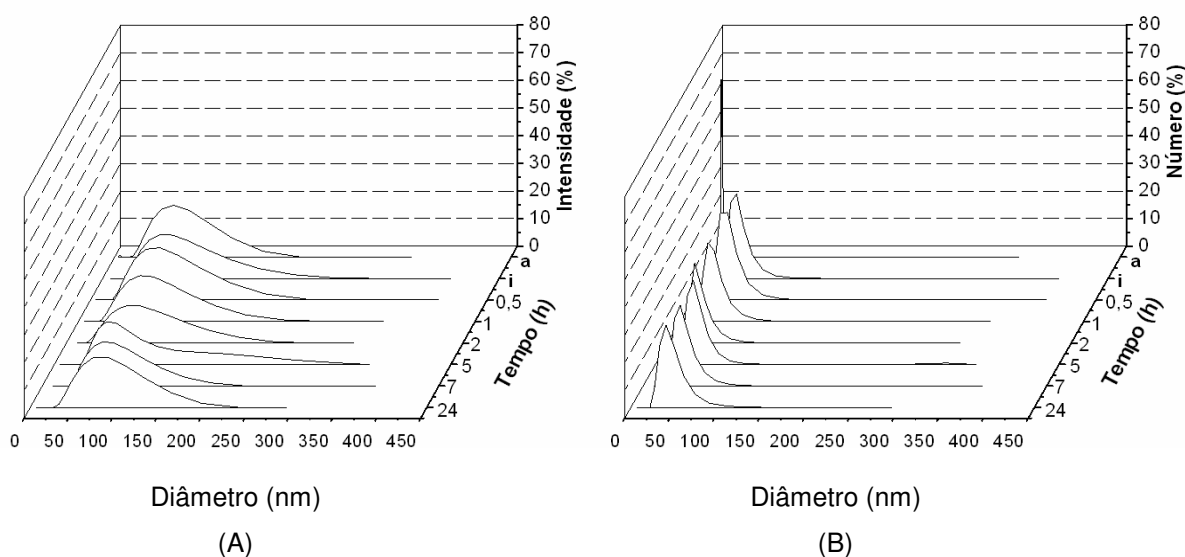


Figura 39 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomos elásticos (25 % PEG-8L), após permeação em 18 atm e 37<sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomos elásticos (25 % PEG-8L)

i – Distribuição para os lipossomos elásticos (25 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 17 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) após permeação na pressão de 18 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	5,3 – 8,4 e 21,2 - 168,6 (99,0% - 71,9)	5,3 – 10,6 (9,0% - 5,9)
i	29,3 – 264,9 (100% - 83,1)	24 – 118,9 (100% - 37,5)
0,5	31,4 – 249,4 (100% - 83,4)	19,8 – 125 (100% - 39,4)
1	25,7 – 232,2 (99,7% - 83,4)	21 – 127,3 (100% - 37,3)
2	25,5 – 232,7 (100% - 84,6)	21,5 – 117,8 (100% - 35,7)
5	35,6 – 324,8 (100% - 91,3)	30 – 117,1 (100% - 44,9)
7	35 – 227,2 (99,2% - 81,9)	29,5 – 115,1 (100% - 44,8)
24	32,1 – 194,7 (100% - 86,2)	26,3 – 130,5 (100% - 43,7)

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L).

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Para a maior pressão avaliada, o diâmetro médio manteve-se constante ao longo das 24 horas, em termos de intensidade. Semelhante à distribuição observada a 12 atm, em termos de número, o diâmetro médio oscilou, atingindo o

mesmo comportamento somente no tempo de 24 horas. Dados de permeação na pressão de 20 atm são apresentados na Figura 40 e Tabela 18.

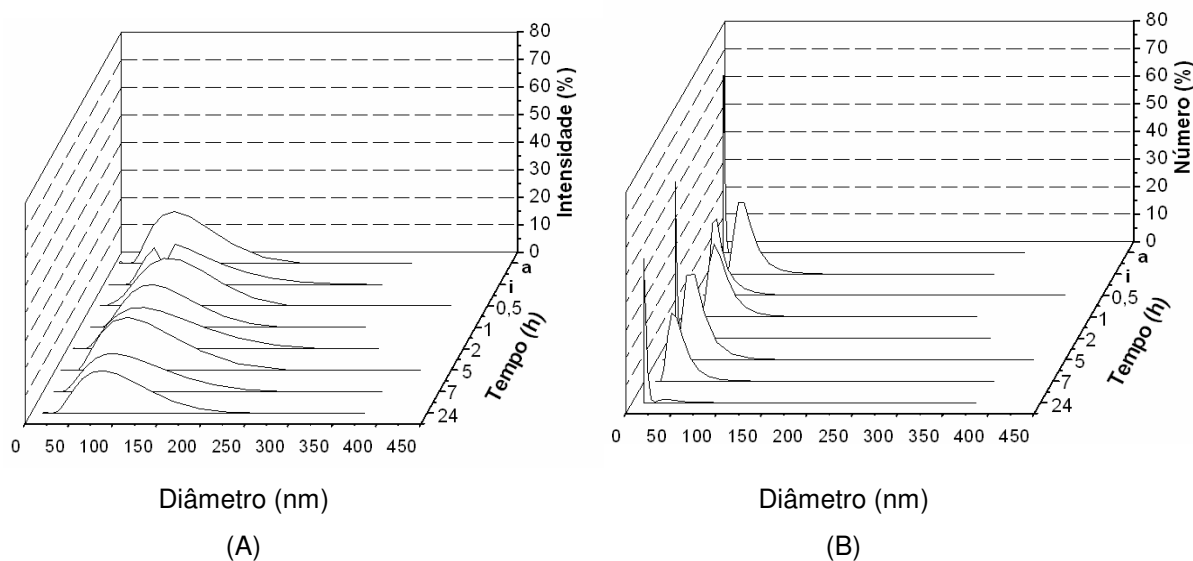


Figura 40 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L), após permeação em 20 atm e 37<sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L)

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 18 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) após permeação na pressão de 20 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	5,3 – 8,4 e 21,2 - 168,6 (99,0% - 71,9)	5,3 – 10,6 (9,0% - 5,9)
i	29,4 – 267,9 (100% - 86,4)	24,8 – 114,5 (100% - 42,4)
0,5	20,3 – 224,2 (100% - 7,6)	16,6 – 100,7 (100% - 27,7)
1	30,1 – 195,4 (100% - 86,5)	25,4 – 117,3 (100% - 41,6)
2	6,5 – 9,6 e 21,5 – 237,4 (99,3% - 90,8)	6,5 – 11,8 e 26,2 – 32,1 (99,8% - 7,3)
5	32,9 – 261,9 (100% - 89,6)	20,8 – 131,2 (100% - 41,6)
7	25,4 – 231,5 (100% - 87,5)	21,4 – 117,2 (100% - 36,4)
24	12,6 – 17,7 e 29,5 – 227,4 (99,3% - 86)	12,6 – 82 (95,3% - 14,1) e (4,7% - 41,9)

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (25 % PEG-8L).

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Com base nos dados de permeação para lipossomas elásticos (25 % PEG-8L) apresentados, conclui-se que as principais mudanças em distribuição de tamanhos ocorreram à pressão de 2,5 atm, com a predominância em número de tamanhos da ordem de 30nm, que oscilam em relação ao tamanho com o tempo.

Embora somente com a caracterização de tamanhos não se consiga explicar com precisão as transições de forma observadas, pode-se concluir que a presença de PEG-8L nos lipossomas elásticos produz perfis de distribuição de tamanhos muito diferentes dos lipossomas convencionais, devido à redução do atrito nos poros anteriormente demonstrada através da reologia.

#### 5.3.1.4 Lipossomas elásticos na proporção 60:40

Os lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) foram permeados utilizando-se os mesmos procedimentos para os lipossomas convencionais, PEG-8L e lipossomas elásticos conforme citados anteriormente.

A Figura 41 mostra dados de permeação para a pressão de 2,5 atm.

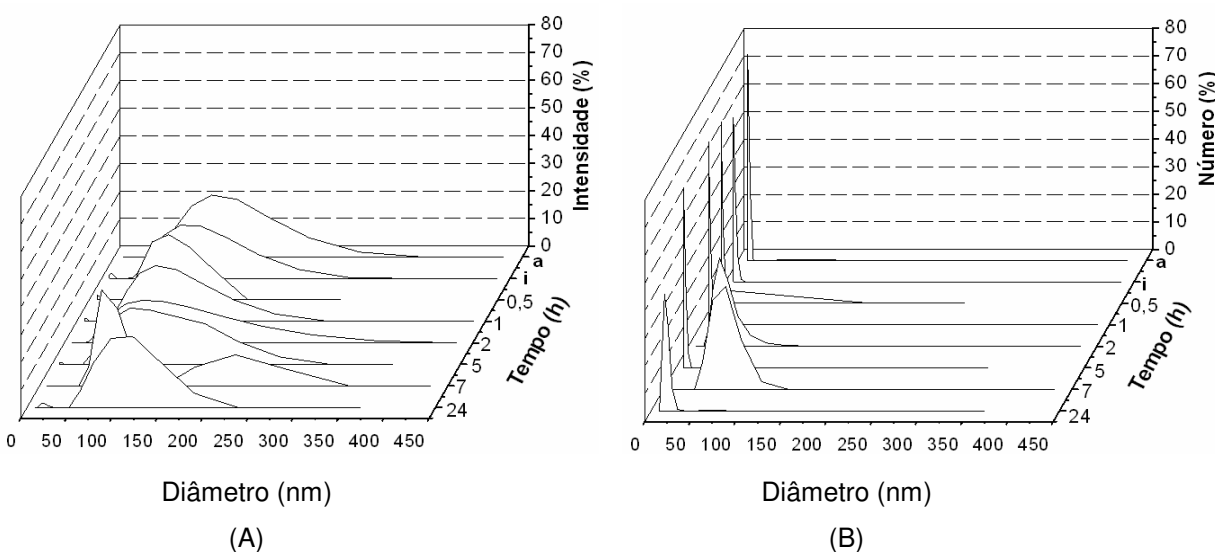


Figura 41 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L), após permeação em 2,5 atm e 37<sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L)

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 19 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) após permeação na pressão de 2,5 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	10,8; 54 – 271 (97,3% - 111)	10,8 – 13,6; 42,9 – 107,8 (98,2% - 11,6)
i	8,7 – 13,8; 34,6 – 274,7 (4,3% - 10,9; 93,9% - 104,1)	8,7 – 17,3 (100% - 9,9)
0,5	8,8 – 11; 43,9 – 174,9; 439,4 (3,2% - 9,8; 90% - 92,4; 6,8% - 450)	8,8 – 13,9 (100% - 9,7)
1	8,7 – 11; 34,7 – 275,7 (2,2% - 9,7; 95,5% - 100,9)	8,7 – 13,8 (100% - 9,6)
2	27,3 – 343,5 (100% - 108,8)	21,7 – 136,7 (100% - 38,8)
5	8,6 – 10,9; 34,4 – 217 (1,6% - 9,8; 96,6% - 101,4)	8,6 – 17,2 (100% - 9,5)
7	54,2 – 271,7 (75% - 76,3; 24,3% - 217,4)	43 – 136,2 (100% - 65,7)
24	14,6 – 23,2; 58,2 – 184,2 (3,6% - 18; 93,9% - 107,9)	11,6 – 29,2; 58,2 – 73,3 (100% - 16)

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L)

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Lipossomas elásticos com 40% de PEG-8L apresentam ampla faixa de distribuição de tamanhos em termos de intensidade. Em termos de número,



destaca-se a predominância de micelas da ordem de 9 nm, decorrentes da maior quantidade de PEG-8L presente na dispersão.

Observa-se também que, na pressão de 5 atm, o aumento na concentração de PEG-8L (Figura 42) não alterou o comportamento observado para lipossomas elásticos com 25% de PEG-8L (Figura 37).

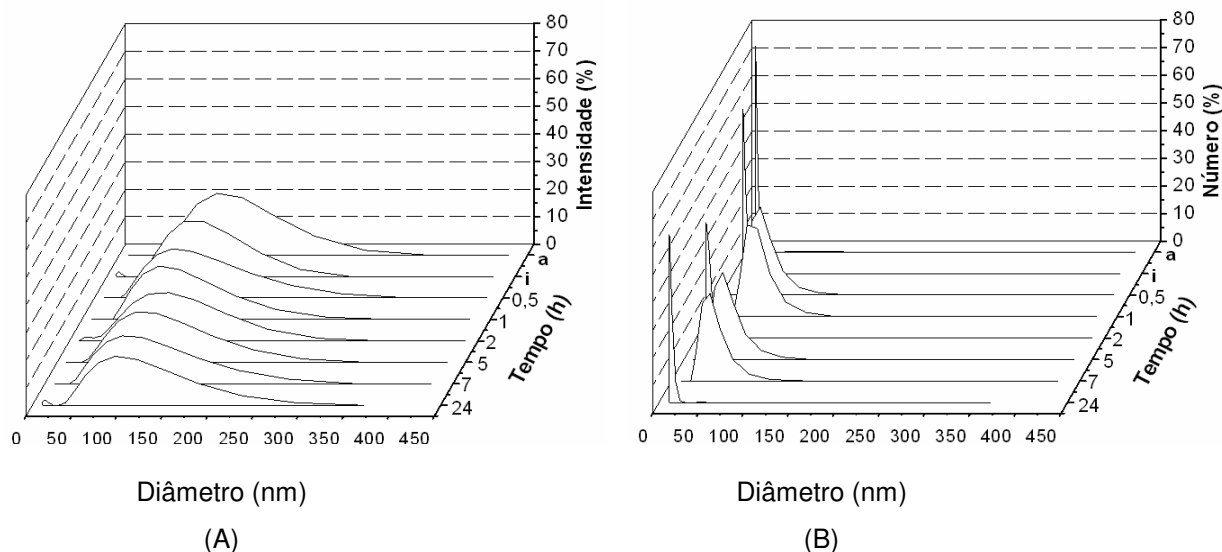


Figura 42 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L), após permeação em 5 atm e 37<sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L).

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 20 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) após permeação na pressão de 5 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	10,8; 54 – 271 (97,3% - 111)	10,8 – 13,6; 42,9 – 107,8 (98,2% - 11,6)
i	10,4 – 16,5; 41,4 – 261,6 (7,9% - 12,7; 88,5% - 105,5)	10,4 – 20,8 (100% - 11,7)
0,5	34,3 – 343,6 (96,8% - 104,7)	27,3 – 136,7 (100% - 45,7)
1	42,7 – 269,4 (95,6% - 101,9)	33,9 – 169,9 (100% - 52,5)
2	10,9 – 275,2 (4,6% - 19,9; 92,4% - 106,5)	10,9 – 54,9 (100% - 14,1)
5	34,1 – 271,4 (96,7% - 105,4)	27,1 – 136 (100% - 46,2)
7	33,8 – 338,5 (96,5% - 104,7)	26,9 – 134,7 (100% - 44,5)
24	11,5 – 18,3; 36,5 – 290,1 (4,1% - 14,3; 91% - 108,8)	11,5 – 23; 45,9 (98% - 13)

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L)

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Dados de permeação para pressões mais elevadas (12, 18 e 20 atm), são mostrados a seguir e demonstram que, com o aumento da pressão, houve maior oscilação na distribuição das partículas tanto em termos de intensidade como em termos de número.

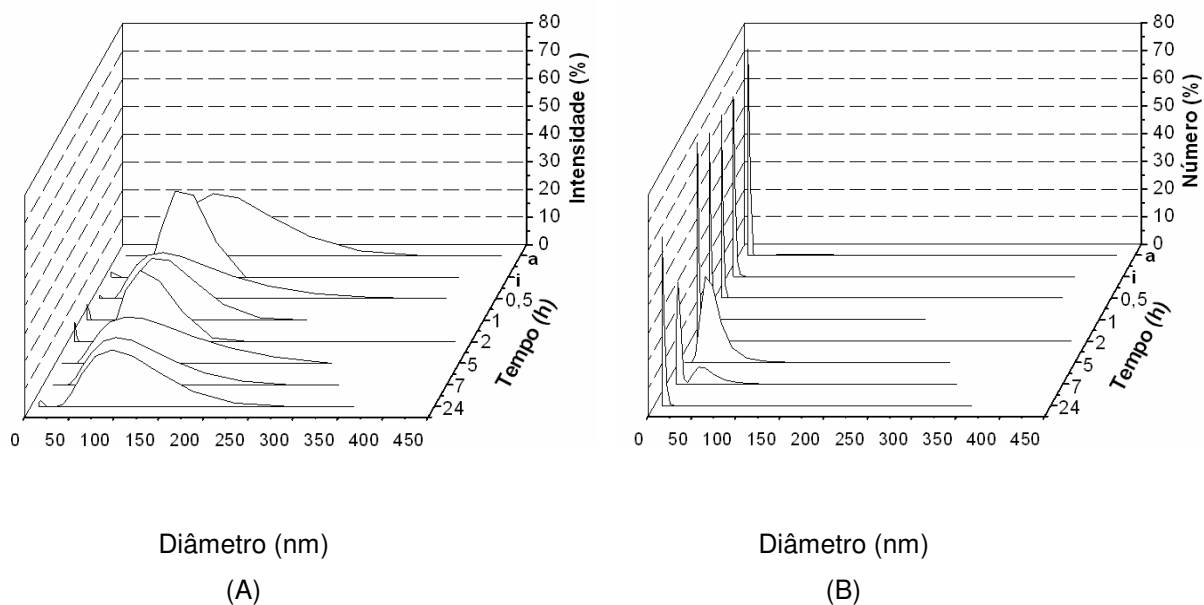


Figura 43 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L), após permeação em 12 atm e 37<sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L)

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 21 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) após permeação na pressão de 12 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	10,8; 54 – 271 (97,3% - 111)	10,8 – 13,6; 42,9 – 107,8 (98,2% - 11,6)
i	7,9 – 15,7; 49,8 – 125,1 (4,9% - 10,3; 91,5% - 88,4)	7,9 – 19,8 (100% - 8,8)
0,5	7,9 – 9,9; 31,3 – 313,8 (1,9% - 8,8; 96,4% - 93,4)	7,9 – 12,5 (99,9% - 8,7)
1	8 – 10; 50,4 – 200,8 (9,7% - 8,9; 87,5% - 93,6)	8 – 12,7 (100% - 8,8)
2	8,1 – 10,2; 51 – 405,8 (9,1% - 8,5; 83,2% - 88,4)	8,1 – 12,8 (100% - 8,7)
5	24,4 – 307,5 (99,6% - 96,4)	19,4 – 122,4 (100% - 37)
7	13,4; 29,8 – 270 (97,5% - 91,8)	11 – 99,2 (78,3% - 13,9; 21,7% - 44)
24	9 – 14,3; 36 – 227,4 (4,4% - 11,1; 92,8% - 98,2)	9 – 18 (100% - 10,2)

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L)

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Para os valores dos diâmetros e distribuições de tamanhos anteriormente apresentados, incluindo-se a pressão de 18 atm (Figura 44 e Tabela 22), verificou-se oscilações no diâmetro médio das partículas, em termos de número. Porém, no tempo de 24 horas, observou-se diâmetro médio de aproximadamente 10 nm.

Para análise de intensidade, a faixa de distribuição de tamanhos apresentou-se semelhante ao longo do tempo avaliado.

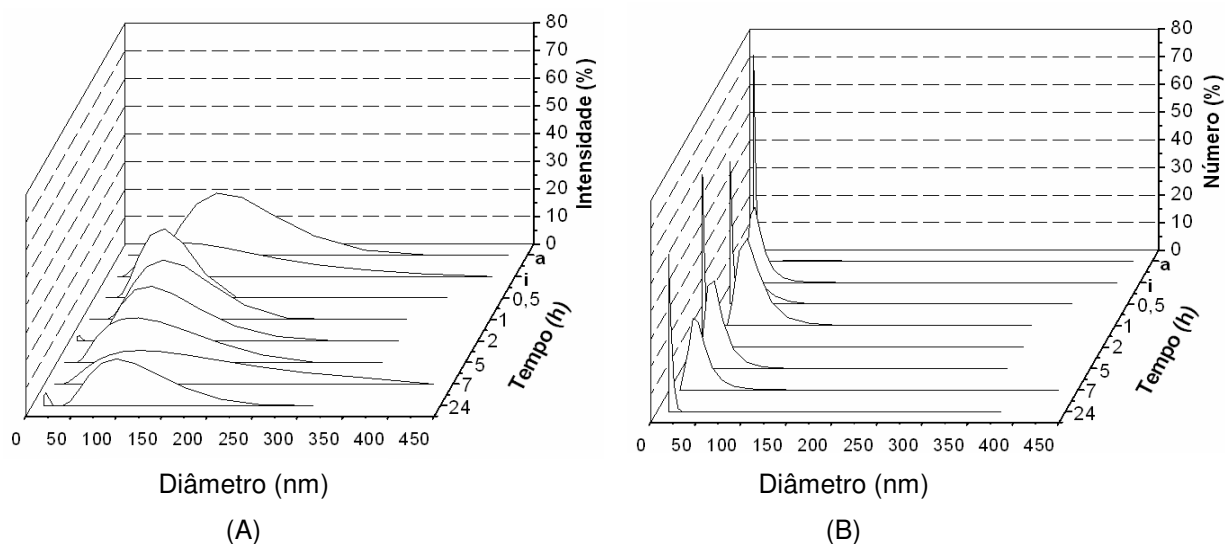


Figura 44 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L), após permeação em 18 atm e 37<sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L)

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 22 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) após permeação na pressão de 18 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	10,8; 54 – 271 (97,3% - 111)	10,8 – 13,6; 42,9 – 107,8 (98,2% - 11,6)
i	21,1 – 425,2 (100% - 105)	14,1 – 104,7 (100% - 27,8)
0,5	30,9 – 112,9 (99,1% - 74,3)	12,3 – 97,6 (69,9% - 13,1; 30,1% - 41,5)
1	35,8 – 225,8 (99,1% - 95)	28,4 – 142,5 (100% - 47,7)
2	9,1 – 14,4; 36,2 – 288,1 (4,1% - 11; 95,1% - 97)	9,1 – 18,2 (99,9% - 10,2)
5	28,5 – 226,2 (98,2% - 93,8)	22,6 – 113,3 (100% - 36,6)
7	17,4 – 428,5 (100% - 104,7)	14,2 – 105,5 (100% - 26,6)
24	12,6 – 18,8; 41,9 – 253,7 (10,4% - 15,4; 84,9% - 101,6)	12,6 – 23 (99,9% - 14,2)

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L)

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

A pressão de 20 atm resultou em uma maior desestruturação do sistema, quando comparados os valores apresentados das permeações nas pressões

anteriores, apresentando comportamento diferenciado (Figura 45), favorecendo a predominância de lipossomas elásticos.

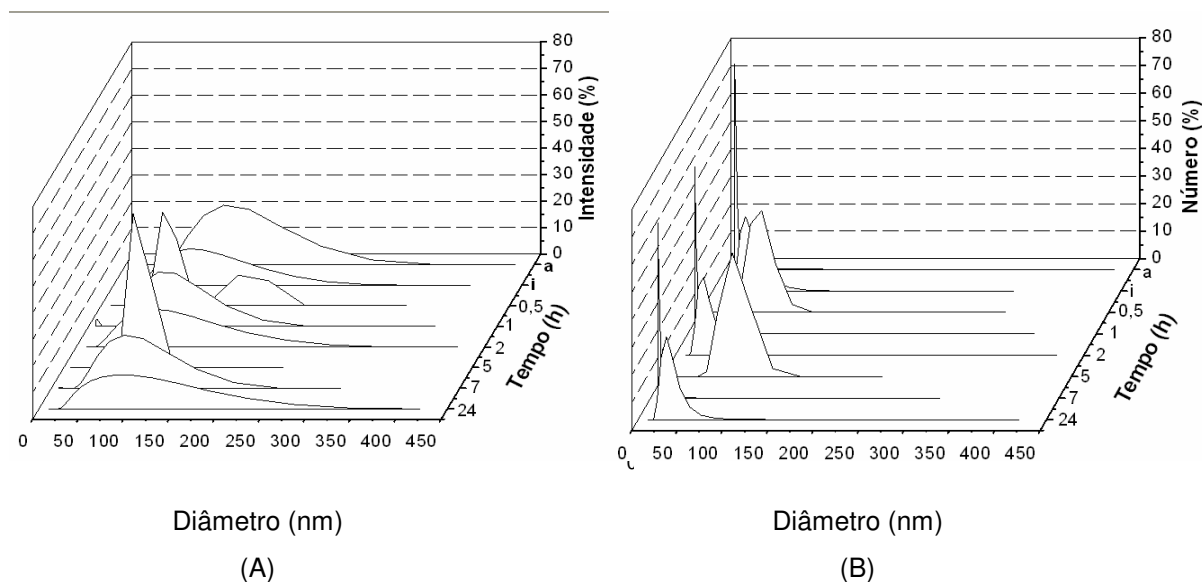


Figura 45 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L), após permeação em 20 atm e 37<sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L)

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 23 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) após permeação na pressão de 20 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	10,8; 54 – 271 (97,3% - 111)	10,8 – 13,6; 42,9 – 107,8 (98,2% - 11,6)
i	30,6 – 279,7 (99,4% - 95,9)	21,8 – 119,5 (100% - 41,3)
0,5	55,5 – 184,6 (74% - 75; 23,1% - 161,3)	45,4 – 184,6 (100% - 65,6)
1	7,6 – 12,1; 38,2 – 191,5 (6,3% - 9,4; 91,5% - 90,9)	7,6 – 15,2 (100% - 8,6)
2	25,5 – 281,6 (99,3% - 96,1)	17,1 – 126,4 (100% - 33,7)
5	60,6 – 96,1 (93,1% - 83,2)	48,1 – 121 (100% - 78,5)
7	8 – 12,7; 31,8 – 200,9 (98,5% - 89,1)	8 – 15,9; 31,8 – 50,4 (99,7% - 8,9)
24	25,5 – 343,9 (99,2% - 103,1)	20,8 – 126,4 (100% - 34,8)

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L)

i – Distribuição para os lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Dos valores de diâmetro e distribuição de tamanhos das partículas apresentados, observou-se que o diâmetro dos lipossomas elásticos é aproximadamente o dobro do diâmetro dos lipossomas convencionais e a distribuição de tamanhos para os lipossomas elásticos apresenta-se numa faixa



de tamanhos mais larga, devido a presença das micelas de PEG-8L presentes na dispersão.

### 5.3.2 Morfologia

Foram realizadas microscopias de transmissão para os lipossomas elásticos com 40 % de PEG-8L, logo após permeação na pressão de 2,5 atm (Figura 46).

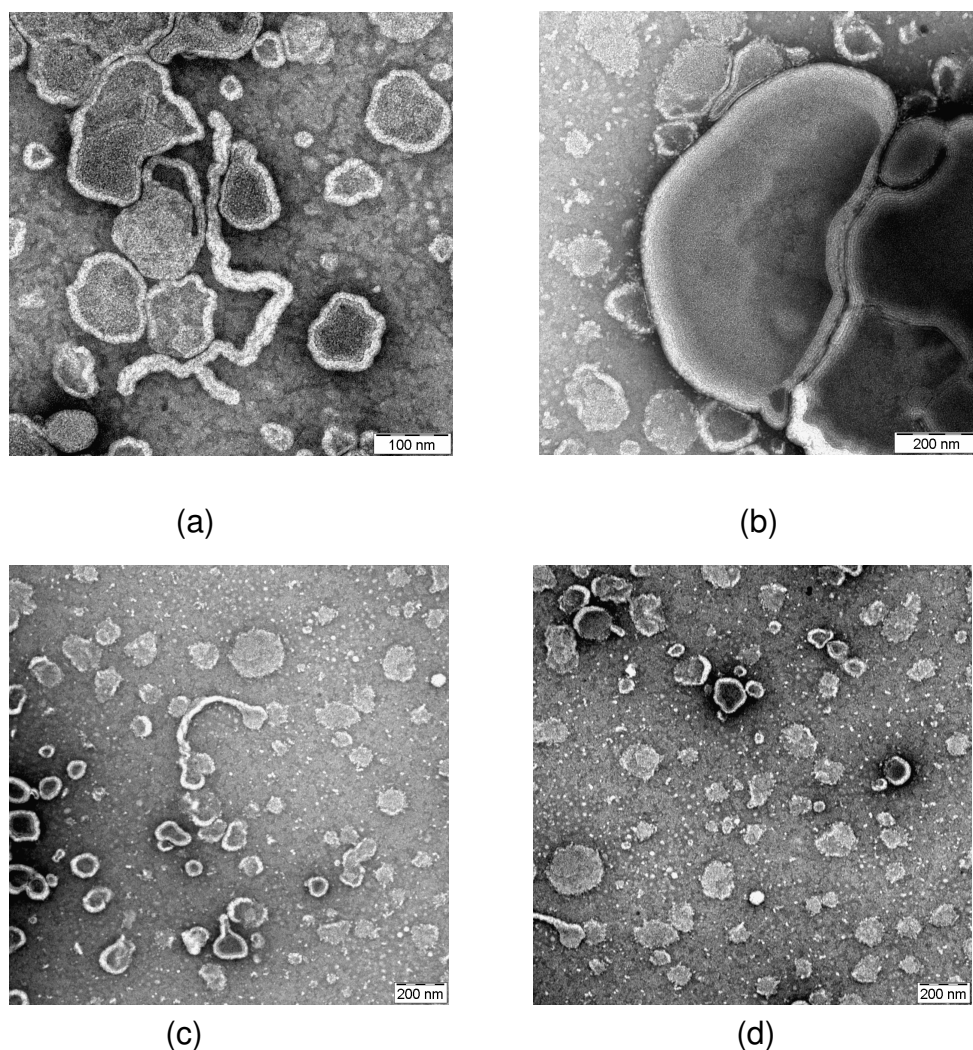


Figura 46 - Micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão de lipossomas elásticos (40 % de PEG-8L), imediatamente após permeação em duas membranas sobrepostas com poros de 30 nm de diâmetro, na pressão de 2,5 atm.

A análise morfológica dos lipossomas elásticos mostra que os lipossomas se deformam, permanecendo intactos após atravessarem as membranas com poros de 30 nm de diâmetro.

Através da micrografia apresentada na Figura 46a, observou-se presença de vesículas elásticas grandes e pequenas, assim como estruturas alongadas. Verificou-se também uma diminuição do halo de tensoativo presente ao redor dos lipossomas indicando que, ao ser comprimido dentro do poro, houve uma reestruturação do arranjo tensoativo-fosfolipídio; grande parte do PEG-8L migrou para a solução, formando pequenas micelas, enquanto uma pequena parte se depositou de forma organizada na parede da vesícula, atuando diretamente no aumento da fluidez dos lipossomas. Este comportamento apresenta coerência com a análise de tamanho de partículas, em termos de número, apresentada na Figura 41.

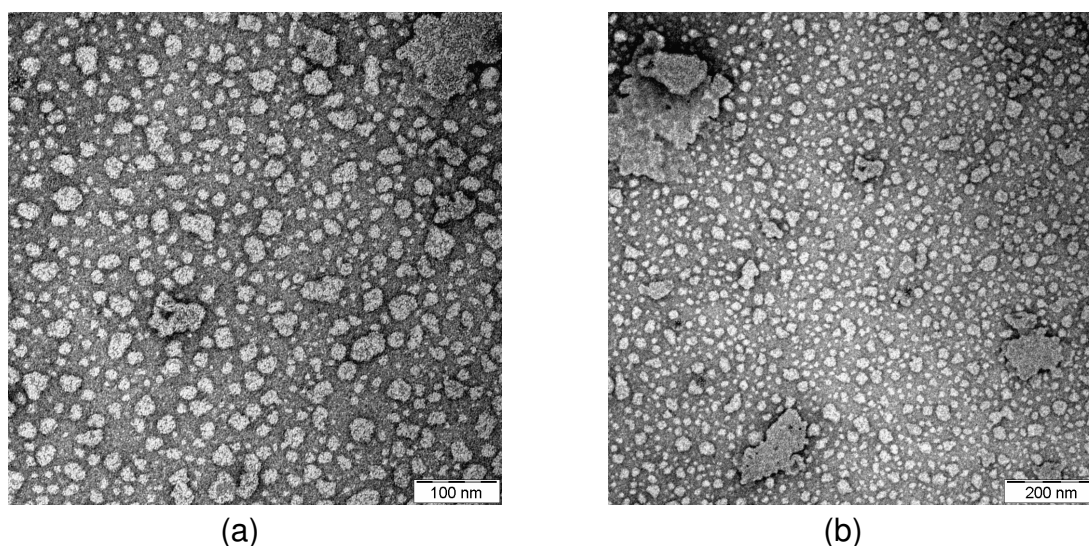


Figura 47 - Micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão de lipossomas elásticos (40 % de PEG-8L), no tempo de 24 h após permeação em duas membranas sobrepostas com poros de 30 nm de diâmetro, na pressão de 2,5 atm.

A Figura 47 apresenta o comportamento dos mesmos lipossomas (40 % PEG-8L) e 2,5 atm, após 24 h de permeação, observando-se um grande número

de partículas pequenas. Pode-se dizer, portanto, que parte do tensoativo foi incorporada nas vesículas até o intumescimento das mesmas, provocando desestruturação e formação de partículas menores

### 5.3.3 Tensão Superficial

A Figura 48 apresenta o comportamento em termos de tensão superficial, da dispersão de lipossomas elásticos preparados a partir de 40 % PEG-8-L, permeados nas pressões de 2,5; 12 e 20 atm. A tensão superficial dos lipossomas elásticos antes da permeação foi medida como controle.

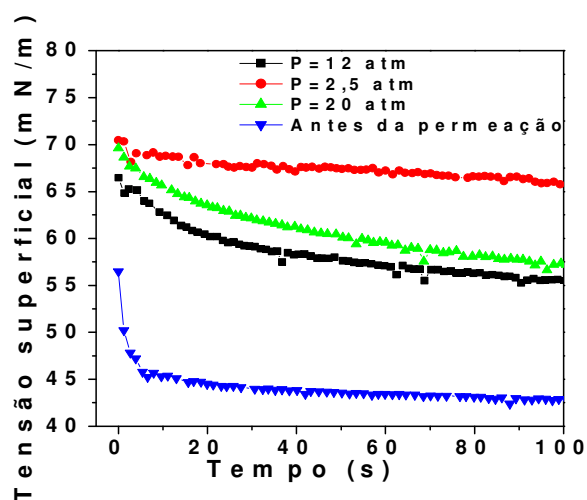


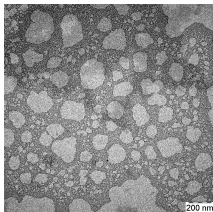
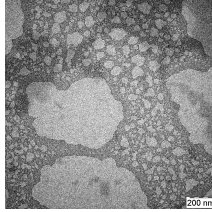
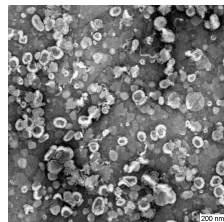
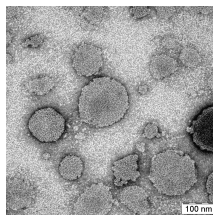

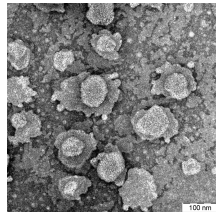
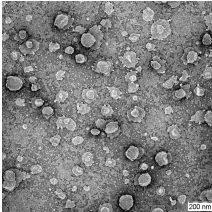
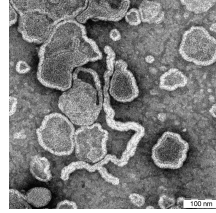
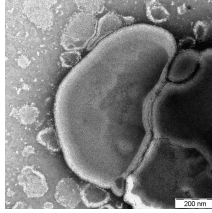

Figura 48 – Influência da pressão de permeação na tensão superficial de lipossomas elásticos preparados a partir de 40 % de PEG-8L.

Antes da permeação, a tensão superficial da dispersão de lipossomas elásticos foi de aproximadamente  $45 \text{ mN.m}^{-1}$ , inferior a dos lipossomas elásticos permeados. Quando a permeação foi feita na pressão de 2,5 atm, a tensão superficial aumentou significativamente, com valor da ordem de  $68 \text{ mN.m}^{-1}$ . Nas pressões de permeação de 12 e 20 atm, os valores de tensão superficial foram próximos, da ordem de  $58 \text{ mN.m}^{-1}$  (aproximadamente).

Portanto, observou-se que a permeação alterou expressivamente a tensão superficial das dispersões. Analisando esses resultados juntamente com as micrografias das Figuras 24 e 46, verificou-se que antes da permeação, o PEG-8L apresentou-se na forma de um halo expandido em torno das vesículas, devido à mobilidade das cadeias e hidratação do polímero. Essa configuração promove grande interação do PEG-8L com o meio aquoso. Adicionalmente, os resultados do item 5.2.1 mostraram que com 40% de PEG-8L inicial, a incorporação foi de 15,4 %, restando, portanto, uma quantidade significativa de PEG-8L em solução, coexistindo na forma de micelas. Esses fatores são responsáveis pelo baixo valor da tensão superficial obtido antes da permeação. Após a permeação com 2,5 atm, observou-se nas micrografias da Figura 46, uma grande contração do halo de PEG-8L em torno das vesículas (Figura 46b) como também a deformação das micelas do polímero livre que se apresentaram em formatos alongados (Figuras 46, a, c e d). Essas mudanças na morfologia reduzem as interações com o meio, além do que a pressão durante a passagem nos poros pode favorecer a incorporação do PEG-8L nas vesículas, reduzindo a quantidade de PEG-8L livre, contribuindo assim para o aumento da tensão superficial. As permeações a maiores pressões, 12 e 20 atm, abaixaram a tensão superficial em relação à permeação a 2,5 atm. Curiosamente, a tensão superficial a 12 e 20 atm é semelhante à dos lipossomas convencionais. Por outro lado, as medidas de diâmetro e distribuição de tamanhos por número (Tabelas 21 e 23) apontam para a presença de micelas de PEG-8L livre, cujos tamanhos aproximados, imediatamente após a permeação, são semelhantes para as pressões 2,5 e 12 atm (10 nm), e maiores (40 nm), para 20 atm. As medidas em termos de intensidade identificam lipossomas também de tamanhos semelhantes da ordem de 100-200nm para as várias pressões. Além da contração do halo de PEG-8L e das mudanças morfológicas observadas, a redução da tensão superficial à maiores pressões (12 e 20 atm), pode ser resultante também da desestruturação das vesículas. Portanto, o comportamento da tensão superficial com a pressão é função de diferentes reduções do halo em torno das vesículas, da própria deformação das vesículas, das diferenças na morfologia das micelas de PEG-8L

após a permeação e desestruturação a altas pressões. A Tabela 24 resume os valores de tensão superficial obtidos nas várias situações.

Tabela 24 - Valores de tensão superficial obtidos para lipossomas convencionais, PEG-8L, lipossomas elásticos antes e após serem permeados e suas respectivas morfologias.

Situação	Tensão Superficial (mN.m <sup>-1</sup> )	Morfologia	
PEG-8L livre *	37		
Lipossomas Convencionais **	60		
Lipossomas com PEG-8L antes da incorporação	47.5		
Lipossomas com PEG-8L após a incorporação	45		
Lipossomas elásticos após permeação à 2,5 atm	68		
Lipossomas elásticos após permeação à 12 e 20 atm	58 (12 atm) 60 (20 atm)		

## 5.4 Teor de Fosfato Após Permeação

A permeação dos lipossomas convencionais e elásticos (25 e 40% de PEG-8L) foi caracterizada quanto ao teor de fosfato após serem permeados em duas membranas sobrepostas, com poros de 30 nm de diâmetro. As pressões nas quais estes foram caracterizados são: 2,5 atm (pressão do gradiente transepidermal), 12 atm (pressão intermediária relativa às que foram aplicadas na permeação) e 20 atm (pressão mais elevada). Os resultados são apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 – Teor de fosfato para os lipossomas convencionais e elásticos (25 e 40 % de PEG-8L), após permeação em duas membranas de policarbonato sobrepostas, com poros de 30 nm de diâmetro, em pressões de 2,5; 12 e 20 atm.

<i>Lipossomas</i>	<b>Pressão (atm)</b>	<b>PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> (mmol.L<sup>-1</sup>) (inicial)</b>	<b>PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> (mmol.L<sup>-1</sup>) (final)</b>	<b>Permeado (%)</b>
Convencional	2,5	1,00	0,0910	9,1
	12		0,1261	12,6
	20		0,4410	44,0
75:25	2,5	0,75	0,1740	23,2
	12		0,2870	38,3
	20		0,7572	100,0
60:40	2,5	0,60	0,1280	21,4
	12		0,2100	35,0
	20		0,6132	100

A dispersão de lipossomas convencionais, cuja concentração inicial foi de  $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , apresentou baixas concentrações de fosfato no permeado mesmo a pressões elevadas (20 atm). Para os lipossomas elásticos com 25 % de PEG-8L, a concentração inicial de fosfolipídio foi de  $0,75 .10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , mostrando que na pressão de 20 atm, diferentemente dos lipossomas convencionais, todo o lipídio adicionado na formação dos lipossomas foi permeado. Da mesma forma, na

pressão de 20 atm, os lipossomas elásticos com 40 % de PEG-8L foram totalmente permeados quando comparados com os lipossomas convencionais. Observou-se também que a permeação dos lipossomas elásticos, em ambas as proporções, foi maior que os lipossomas convencionais, em todas as pressões analisadas. Assim, conforme valores apresentados (Tabela 25), observou-se que a presença de maiores teores de fosfato nos permeados dos lipossomas elásticos comprova que essas vesículas se deformam e passam através da membrana, enquanto os lipossomas convencionais, por serem mais rígidos, tendem a ficar retidos, obstruindo os poros da membrana e produzindo uma filtração da solução.

## **5.5 Reologia de Lipossomas em Membranas de Nanoporos**

### **5.5.1 Características da curva de vazão *versus* pressão e determinação da permeabilidade para a água**

A curva de vazão *versus* queda de pressão foi inicialmente analisada para a água com o objetivo de validar-se a Lei de Darcy no escoamento em membranas de nanoporos. Na Figura 49 é possível observar o comportamento linear da vazão de água com o aumento da pressão aplicada ao sistema, com elevado coeficiente de correlação do ajuste ( $R^2 = 0,9977$ ), conforme prevê a Equação 9. No entanto, observa-se que a reta obtida não passa pela origem. Portanto, como não há sentido em se considerar vazões negativas e seguindo a tendência dos pontos experimentais, pode-se inferir que há a necessidade de uma pressão mínima para início da permeação, devido à resistência imposta pelo pequeno diâmetro dos poros e reduzida porosidade da membrana utilizada. É provável que nessas condições ocorra a formação de um filme de água sobre a membrana, e que a tensão superficial da água deva ser rompida para o início do escoamento. Essa tendência também pode ser observada nos resultados experimentais obtidos por Hunter e Frisken (1998).

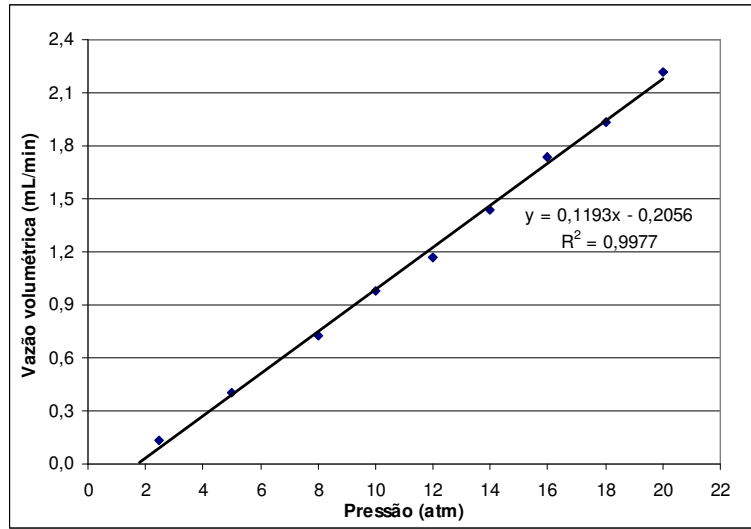


Figura 49 – Curva de permeação de água deionizada em duas membranas de policarbonato sobrepostas, com poros de 30 nm de diâmetro.

O coeficiente de permeabilidade, calculado a partir do coeficiente angular da curva de vazão volumétrica versus pressão (Equação 9), desconsiderando-se a pressão mínima, foi de  $3,36 \cdot 10^{-14}$  m. Nesse cálculo foi utilizada a viscosidade da água igual a 0,71 cP, relativa à temperatura de operação do sistema (37°C) (Welty, 2001). Os parâmetros da membrana estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26 – Parâmetros geométricos da membrana de nanoporos utilizada permeação de água deionizada.

Parâmetros	Valores
Raio dos poros	15 nm
Concentração de poros	$6,0 \cdot 10^8$ poros/cm <sup>2</sup>
Área	4,15 cm <sup>2</sup>
Espessura de membrana	6,0 µm
Porosidade	0,004

A tortuosidade do sistema poroso foi estimada considerando um quadrado inscrito à membrana, de diagonal igual ao diâmetro da circunferência (Figura 50),



e a partir de correlações geométricas, foi determinada sua área em função da área da membrana. Esse quadrado possui área de  $2,64 \text{ cm}^2$ .

Nessa área quadrada, é possível observar um padrão, no qual 4 poros dispostos 2 a 2 formam um quadriculado; 9 poros, dispostos 3 a 3 formam 4 quadriculados, 16 poros, dispostos 4 a 4, formam 9 quadriculados, e assim sucessivamente. Dessa forma,  $(a+1)^2$  poros formam  $a^2$  quadriculados. É então possível determinar o número de quadriculados existentes no interior do quadrado a partir da concentração de poros por centímetro quadrado e a área do quadrado, onde se observa um valor de  $1,59 \cdot 10^9$  quadriculados.

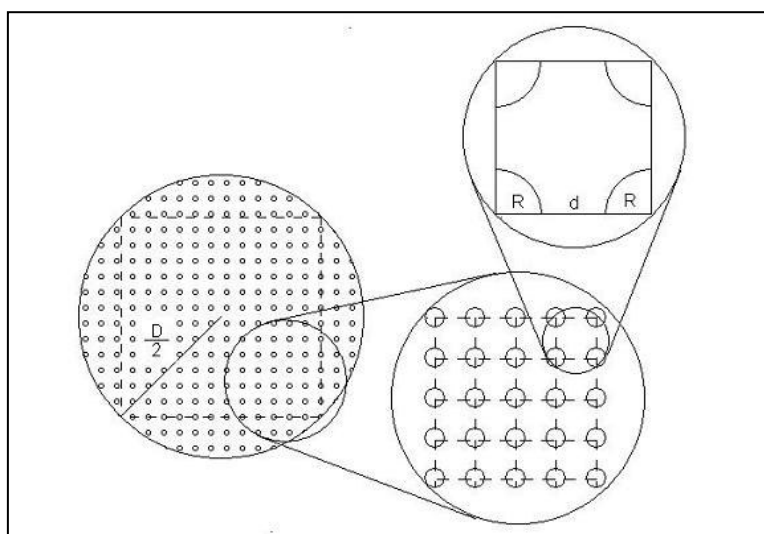


Figura 50 – Esquema utilizado para estimativa da tortuosidade do sistema de duas membranas sobrepostas. À esquerda, vê-se um quadrado inscrito à circunferência da membrana. O zoom apresentado no canto inferior direito mostra o padrão de formação de quadriculados em relação ao número de poros. Novamente, a ampliação apresentada no canto superior direito mostra o lado de cada quadriculado, formado por dois raios de poro, mais a distância entre eles.

Cada um desses quadriculados possui um lado igual à soma de dois raios de poro, mais a distância entre estes poros. Essa distância pode ser determinada a partir da área de cada quadriculado, que por sua vez é determinado pela área total do quadrado, dividido pelo número de quadriculados. O valor da distância d entre os poros é 0,38  $\mu\text{m}$ .

O maior caminho percorrido por uma molécula na permeação do sistema, que conta com duas membranas sobrepostas, é aquele em que ela se encontra no centro de um quadriculado, migrando até o raio do poro e em seguida atravessando uma distância equivalente à espessura da membrana, caindo sobre o centro de outro quadriculado na segunda membrana, onde novamente, migra até o raio do poro para atravessá-la. O caminho efetivo percorrido pela molécula nessa situação é de aproximadamente 12,6  $\mu\text{m}$ , frente à espessura de 12  $\mu\text{m}$  proveniente da espessura das duas membranas. A tortuosidade, então, é igual a 1,05 e mostra que o deslocamento horizontal da molécula não é significativo, em comparação ao deslocamento vertical.

A estimativa da tortuosidade permite calcular o coeficiente de permeabilidade teórico,  $K_{\text{teo}}$ , (Equação 7). Dessa forma obtém-se o valor  $9,47 \cdot 10^{-15}$  m.

Esse valor é pouco mais de três vezes menor que o coeficiente de permeabilidade experimental ( $3,36 \cdot 10^{-14}$  m). O parâmetro de maior sensibilidade na determinação da permeabilidade teórica é o raio do poro, que de acordo com a Equação 7, é elevado à quarta potência (essa variável é elevada à segunda potência no cálculo da porosidade e novamente elevada à segunda potência no cálculo de permeabilidade). Atribui-se a diferença entre os valores experimental e teórico à distribuição de tamanhos de poros intrínseca da membrana, que não é fornecida pelo fabricante. Pequenos valores acima do raio nominal de 15 nm afetam de modo expressivo o resultado da permeabilidade teórica. Um raio de 20 nm aumentaria o coeficiente de permeabilidade para  $2,99 \cdot 10^{-14}$  m, uma diferença de apenas 12% entre valor experimental e teórico.

A Tabela 27 apresenta os valores de permeabilidades experimental e teórico.

Tabela 27 – Valores do coeficiente de permeabilidade de duas membranas de polycarbonato sobrepostas, com diâmetro nominal de poro de 30 nm e espessura de 6,0  $\mu\text{m}$ , obtidos da permeação de água deionizada.

K experimental (m)	K teórico (m)
$3,36 \cdot 10^{-14}$	$9,47 \cdot 10^{-15}$

#### 5.5.2 Características da curva de vazão *versus* pressão e determinação da permeabilidade para os lipossomas

As curvas de permeação dos lipossomas caracterizados nos itens 5.1 e 5.2 estão apresentadas na Figura 51, juntamente com a curva de permeação de água, já apresentada na Figura 49. Nela é possível observar uma permeação bastante reduzida da dispersão de lipossomas convencionais, mesmo a altas pressões, em que alcança uma vazão de 0,09 mL/min a 20 atm. Já os lipossomas elásticos apresentaram-se mais fluidos e com maiores valores de vazão que os lipossomas convencionais a pressões acima de 10 atm, o que mostra que a incorporação de PEG-8L de fato contribui para o aumento da permeação das vesículas, conforme proposto por Bouwstra *et al.* (2003). A importância do PEG-8L como promotor da permeação de lipossomas também pode ser verificada pelos maiores valores de vazão para os lipossomas preparados com maior porcentagem de tensoativo. Os ensaios foram realizados com soluções preparadas com 25% e 40% de tensoativos, pois foram identificadas como as que promoveram maior estabilidade às dispersões no trabalho de Barbosa (2005).

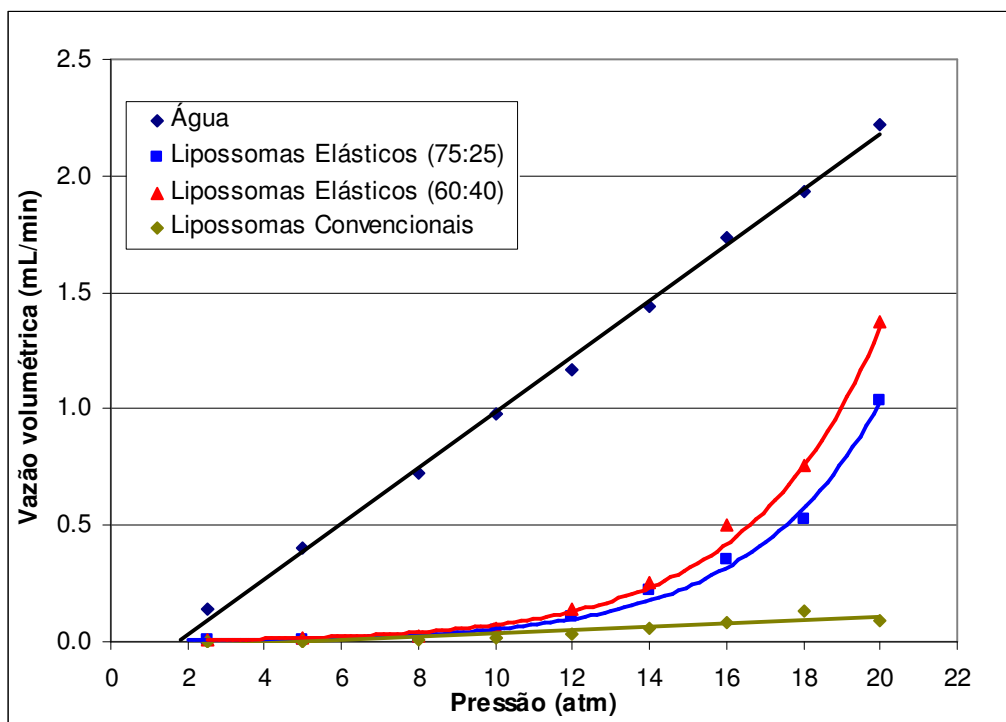


Figura 51 – Curvas de permeação de água deionizada, lipossomas convencionais e elásticos em duas membranas de polycarbonato sobrepostas, com diâmetro nominal de poros 30 nm.

Observou-se também, na Figura 51, que para pressões acima de 18 atm, as curvas para os lipossomas elásticos apresentaram um comportamento exponencial bem definido. Esse comportamento foi explicado teoricamente por Bruisma (1996) para lipossomas convencionais, onde o autor demonstra que a velocidade (proporcional à vazão) apresenta um comportamento exponencial com o aumento do valor de excedente de pressão, atingindo a linearidade após uma pressão crítica igual a 4 vezes a pressão osmótica no interior da vesícula. Nessa condição, ocorre a permeação da água do interior das vesículas, simultaneamente à sua deformação. No nosso caso, tratando-se de dispersões diluídas, observou-se que as curvas tendem a encontrar a reta da permeação da água, evidenciando o pouco efeito das vesículas na permeação a altas pressões.

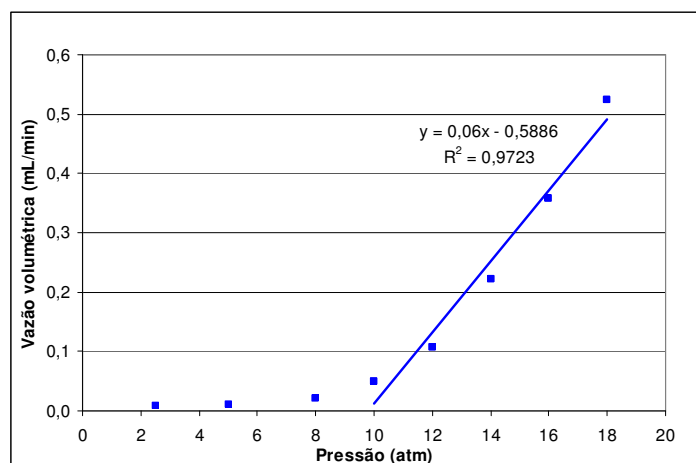
Já nos lipossomas convencionais, a tendência anteriormente referida não foi clara na faixa de pressões dos ensaios realizados. Uma observação importante

é que a curva obtida neste trabalho para os lipossomas convencionais obtiveram comportamento diferente do apresentado por Frinsken *et al.* (2000), uma vez que o seu estudo contemplava a extrusão de MLV's para redução e homogeneização de tamanhos das vesículas, enquanto que neste presente trabalho as vesículas já se encontram homogeneizadas.

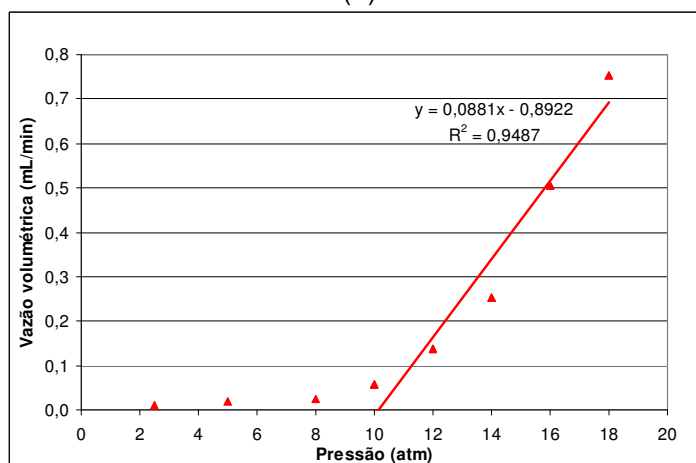
Analisando-se as curvas para pressões até 18 atm, verificou-se que as permeações das dispersões lipossomais só foram iniciadas a partir de uma pressão mínima, como proposto por Friskén *et al.* (2000). Essa pressão está relacionada à energia necessária para vencer a resistência da membrana à permeação de vesículas maiores que o diâmetro dos poros. No caso dos experimentos de Friskén *et al.* (2000) com MLVs, essa pressão corresponde à tensão de ruptura da bicamada lipídica, que produz a redução de tamanhos das vesículas através da passagem pela membrana. No caso de lipossomas elásticos, é coerente considerar-se que essa pressão mínima está associada com a pressão mínima para promover a deformação das vesículas mantendo a sua integridade, permitindo assim que os lipossomas penetrem num poro menor que seu diâmetro inicial.

Para determinação mais precisa das pressões mínimas e também para o cálculo do coeficiente de permeabilidade, os dados experimentais para os lipossomas convencionais e elásticos foram ajustados a retas na faixa de pressão de 10 a 18 atm, como mostra a Figura 52.

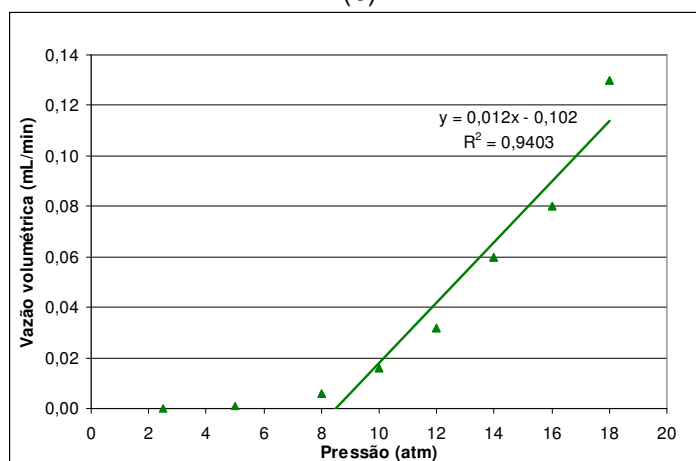
Essas retas permitiram verificar o ponto de intersecção do ajuste com o eixo das abcissas, que determina a pressão mínima de permeação para os vários lipossomas. As pressões mínimas determinadas foram: 9,8 atm para lipossomas elásticos (25% de PEG-8L), 10,1 atm para lipossomas elásticos (40% de PEG-8L) e 8,5 atm para lipossomas convencionais. Esses resultados mostraram que não há diferença significativa entre as várias pressões e sugerem que a presença de PEG-8L incorporado favorece o deslizamento da vesícula ao longo do poro durante a permeação, reduzindo a perda de energia na forma de atrito viscoso, e permitindo assim a obtenção de maiores valores de vazão.



(a)



(b)



(c)

Figura 52 – Permeação das dispersões lipossomais na região de 8 a 18 atm, ajustadas a uma reta. (a) Lipossomas elásticos preparados com 25% de PEG-8L

(b) Lipossomas elásticos preparados com 40% de PEG-8L (c) Lipossomas convencionais.

É interessante observar, que o teor de fosfato quantificado após a realização das permeações nas pressões de 2,5 e 12 atm apresentados na Tabela 25 foi baixo, pois as pressões encontram-se abaixo (ou pouco acima) da pressão mínima de escoamento observadas. No caso dos lipossomas convencionais, a quantificação do teor de fosfato (Tabela 25), mesmo a altas pressões, sugere rompimento e obstrução das vesículas nos poros da membrana, como já mencionado. Contudo, no caso dos lipossomas elásticos, pode-se sugerir, a julgar pela permeação de 100% dos fosfolipídios a 20 atm, um salta na quantidade de fosfolipídios permeados a partir de 12 atm. A ausência de quantificações entre estas duas pressões impede uma conclusão mais aprofundada.

De acordo com Frisken *et al.*, (2000), o valor de pressão mínima pode ser utilizado juntamente com os dados de diâmetro médio da partícula para a determinação da tensão de ruptura ( $\gamma$ ) da bicamada a partir da Equação 10.

Conforme considerações anteriores, para lipossomas elásticos essa tensão estaria associada com à deformação, não à ruptura. Desse modo, usou-se a Equação 10 para os lipossomas elásticos como uma estimativa da tensão de deformação. Os valores encontrados encontram-se na Tabela 28.

Tabela 28 – Valores de pressão mínima aplicada ao sistema e tensão de ruptura ou deformação dos lipossomas convencionais e elásticos, respectivamente.

<b>Lipossomas</b>	<b>P<sub>min</sub> (atm)</b>	<b><math>\gamma</math> (mN/m)</b>
Convencionais	8,5	8,3
Elásticos (75:25)	9,8	9,1
Elástico (60:40)	10,1	8,7

A tensão de ruptura dos lipossomas convencionais, calculada a partir do modelo matemático, está em acordo com os valores apontados por Frisken *et al.*

(2000), de  $8,3 \pm 0,5$  mN/m, obtidos por Rawicz e Evans com técnica de aspiração em pipeta de vesículas formadas por POPC (1-palmitol-2-oleil-sn-fosfatidilcolina).

No caso de lipossomas elásticos, a tensão calculada é semelhante, apesar do diâmetro considerado ser bem maior, verificando-se então que a presença de tensoativo na bicamada não altera a energia necessária à deformação da vesícula, composta por fosfolípido, mas sim impedindo que exista rompimento da bicamada. Esses resultados são indicativos da capacidade de deformação dos lipossomas elásticos.

Os coeficientes de permeabilidade foram então analisados a partir do coeficiente angular das retas observadas na Figura 52. Os valores estão apresentados na Tabela 29, juntamente com o valor de permeabilidade experimental para água.

Tabela 29 – Valores experimentais de coeficiente de permeabilidade para água e dispersões lipossomais em sistema com duas membranas de polycarbonato sobrepostas, com diâmetro de poro de 30 nm e espessura de 6,0  $\mu$ m.

<b>Amostra</b>	<b>Permeabilidade (m)</b>	<b>Redução em relação à água</b>
Água Deionizada	$3,36 \cdot 10^{-14}$	-
Lipossomas elásticos (75:25)	$1,57 \cdot 10^{-14}$	2,14
Lipossomas elásticos (60:40)	$2,30 \cdot 10^{-14}$	1,46
Lipossomas convencionais	$3,14 \cdot 10^{-15}$	10,70

A tabela mostra que os lipossomas elásticos possuem uma permeabilidade pouco menor que a da água, dada a perda de energia pelo contato entre a parede da vesícula e a parede do poro, porém, muito maior que a dos lipossomas convencionais, em um fator de 10 vezes. Em termos de ordem de grandeza, o coeficiente de permeabilidade dos lipossomas elásticos é o mesmo que o da água. Assim, acima da pressão mínima necessária à deformação dos lipossomas elásticos, pode ser considerado que existe pouca influência da camada de lubrificação ou do Número Capilar na permeação da dispersão devido



ao amortecimento do atrito com a incorporação de PEG-8L, que se deposita na superfície dos lipossomas, com permeabilidades próximas à da água. Também deve ser considerado que as dispersões utilizadas neste trabalho não são concentradas.

O fator de redução da permeabilidade, apresentado nas Equações 19 e 20 foram calculados a partir do número de vesículas por unidade de comprimento e do comprimento do esfero-cilindro que passa pelo poro.

A concentração de vesículas no permeado foi estimada a partir da metodologia apresentada no item 4.2.5. O número de vesículas por unidade de comprimento foi calculado a partir da Equação 29:

$$n = \frac{C_L v_a}{V t_p} \quad (\text{Eq. 29})$$

em que  $C_L$  é a concentração de lipossomas na amostra de volume  $v_a$ ,  $V$  é a velocidade no poro e  $t_p$  o tempo de permeação.

O comprimento do esfero-cilindro foi calculado a partir da Equação 13, considerando o diâmetro médio dos lipossomas convencionais para todos os lipossomas, pois as análises de micrografia após a permeação (Figura 46) mostraram que grande parte do halo de PEG-8L deixa a bicamada após a permeação e que os diâmetros de permeado voltam a estar próximos aos dos convencionais não incubados com tensoativo. Os valores dos cálculos realizados estão resumidos na Tabela 30.

Os valores teóricos dos fatores de redução para lipossomas convencionais e elásticos, preparados com 25% e 40% de PEG-8L foram: 1,74; 2,27 e 2,03, respectivamente.

Tabela 30 – Valores de concentração lipossomal, vesículas por unidade de comprimento e comprimento do esfero-cilindro.

<b>Lipossomas</b>	<b>Concentração de Lipossomas (<math>10^{15} \text{ L}^{-1}</math>)</b>	<b>Vesículas por unidade de comprimento <math>n</math> (<math>10^{-6} \text{ nm}^{-1}</math>)</b>	<b>Comprimento do esfero-cilindro (nm)</b>
Convencionais	3,06	2,16	1.348
Elásticos (75:25)	5,25	3,71	1.348
Elásticos (60:40)	4,24	3,00	1.348

A Tabela 31 apresenta estes resultados comparativamente aos valores do mesmo fator obtido pelas razões dos coeficientes de permeabilidade experimentais, seguido do erro.

Tabela 31 – Fatores de redução teóricos e experimentais para o coeficiente de permeabilidade dos lipossomas convencionais e elásticos, com respectivo erro

<b>Lipossomas</b>	<b>Fator de redução experimental</b>	<b>Fator de redução teórico</b>	<b>Erro (%)</b>
Convencionais	10,70	1,74	515,0
Elásticos (75:25)	2,14	2,27	6,1
Elásticos (60:40)	1,46	2,03	39,0

Os valores dos erros foram bastante variados em função dos diferentes tipos de lipossomas, com maior erro para os lipossomas convencionais.

Esse maior erro pode ser justificado pelo fato da permeação ter sido bastante afetada e descaracterizada pelo rompimento das bicamadas, seguido de obstrução e retenção de fosfolípidios na membrana, com alteração do número de poros viáveis, atuando diretamente nos cálculos teóricos.

O valor de fator de redução para os lipossomas preparados com 25% de tensoativo obteve a melhor aproximação, com variação de 6% entre os resultados teórico e experimental, validando o modelo de permeação de vesículas

deformáveis proposto por Bruinsma (1996). Já o cálculo de fator de redução para os lipossomas elásticos preparados com 40% de PEG-8L apresentou erro de quase 40%.

## **5.6 Influência da Incorporação da Cafeína em Lipossomas Elásticos**

### **5.6.1 Quantificação de cafeína no extrato**

A concentração de cafeína presente no extrato de guaraná foi determinada através da curva de calibração de cafeína pura em água (Anexo 1) num comprimento de onda 270 nm. O extrato livre apresentou 56,2% de cafeína.

### **5.6.2 Quantificação de cafeína incorporada**

Os valores correspondentes às porcentagens de incorporação da cafeína em lipossomas convencionais e elásticos nas proporções (25 e 40%), são apresentados na Tabela 32.

Tabela 32 – Porcentagem de incorporação de cafeína nas dispersões lipossomais.

<b><i>Tipo</i></b>	<b>% Incorporação</b>
Lipossomas Convencionais	11,00
Lipossomas Elásticos (75:25)	41,87
Lipossomas Elásticos (60:40)	39,90

Observou-se que, para os lipossomas elásticos, as porcentagens calculadas foram cerca de 4 vezes maiores que a dos convencionais. Atribui-se esse comportamento ao aumento da fluidez da membrana pela incorporação do PEG-8L, favorecendo a difusão de cafeína para o interior dos lipossomas elásticos, como também à incorporação da cafeína nas micelas de PEG-8L, na forma de micelas mistas.

## 5.7 Transição de Formas

As transições de formas das partículas contidas nas dispersões de lipossomas elásticos, preparados a partir de 40% de PEG-8L, antes e após as permeações às pressões de 2,5, 12 e 20 atm, foram avaliadas em termos de diâmetro e distribuição de tamanhos. A solução de cafeína livre em água foi tomada como controle.

### 5.7.1 Solução de cafeína livre

Durante a realização dos experimentos para a pressão de 2,5 atm, observou-se que não houve permeação para a solução de cafeína livre em água. Para a pressão de 12 atm, houve permeação e os dados são apresentados na Figura 53 e Tabela 33.

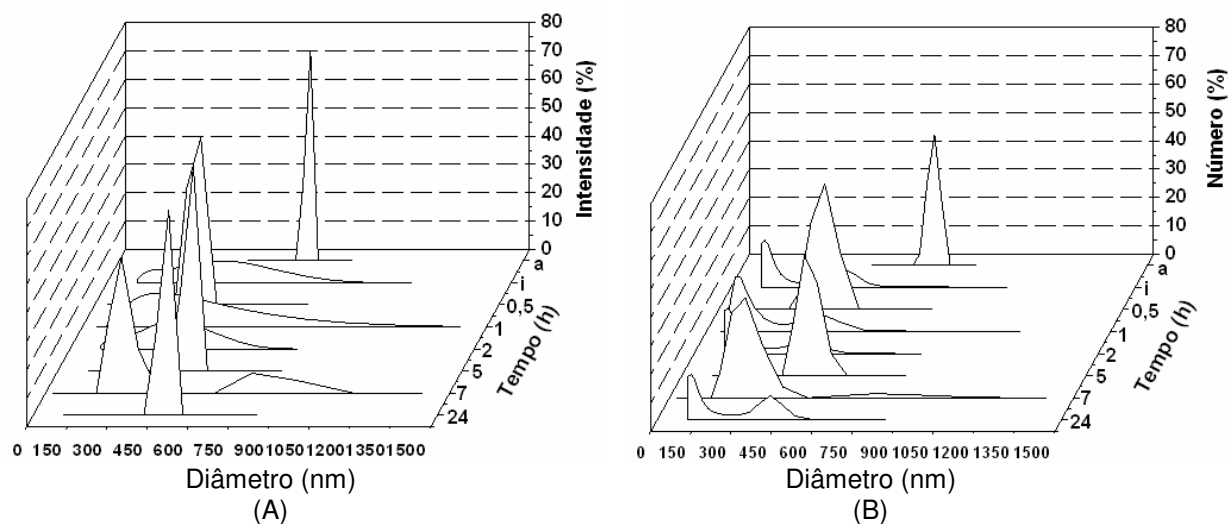


Figura 53 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos de cafeína pura em água, com concentração  $1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , após permeação em 2,5 atm e  $37^{\circ} \text{C}$ , durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação de cafeína pura em água

i – Distribuição para a solução de cafeína pura em água imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 33 - Distribuições de tamanhos da solução de cafeína pura em água, após permeação na pressão de 2,5 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	682,2 – 709,9 (100% - 702,5)	655,5 – 738,7 (100% - 705,7)
i	113,1 – 925,9 (100% - 362,2)	113,1 – 837,7 (76,9% - 148,2; 22,3% – 406,3)
0,5	342,4 – 393,8 (100% - 372,6)	297,7 – 452,9 (100% - 384)
1	91 – 1382,7 (100% - 354,6)	76,7 – 830,1 (83,3% - 138,5; 16,7% – 416,4)
2	114,1 – 764,5 (100% - 336,6)	114,1 – 691,7 (72,7% - 149,9; 27,3% - 404,4)
5	454,3 – 502,2 (100% - 488,8)	411 – 555 98% - 470)
7	230,3 – 343,8; 765,8 – 935,6 (87,2% - 278,4; 11,4% - 831,1)	188,5 – 1143 (96,7% - 274; 3,2% - 793,5)
24	446 – 500 (100% - 476)	115 – 840 (60% - 150; 18% - 440)

a – Distribuição obtida antes da permeação de cafeína pura em água

i – Distribuição para a solução de cafeína pura em água imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Os resultados mostram que antes da permeação a distribuição é unimodal, com diâmetro médio em torno de 700 nm. Após a permeação, há o aparecimento de duas populações menores, resultante do rompimento dos

agregados de cafeína em água, com crescimento e subsequente reestruturação ao longo de 24 horas.

Os dados obtidos na permeação a pressão de 20 atm são apresentados na Figura 54 e Tabela 34.

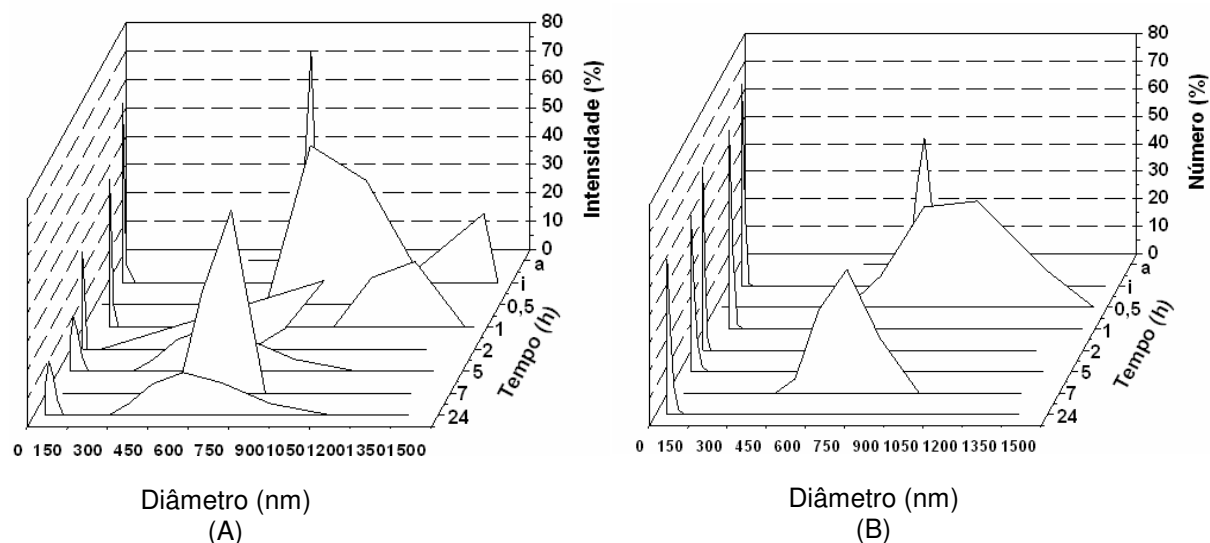


Figura 54 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos de cafeína pura em água, com concentração  $1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , após permeação em 5 atm e  $37^{\circ} \text{C}$ , durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

a – Distribuição obtida antes da permeação de cafeína pura em água

i – Distribuição para a solução de cafeína pura em água imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 34 - Distribuições de tamanhos da solução de cafeína pura em água, após permeação na pressão de 20 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	682,2 – 709,9 (100% - 702,5)	655,5 – 738,7 (100% - 705,7)
i	56,7 – 69,3; 1143,5 – 1397 (69,4% - 57,9; 30,6% - 1377,9)	56,7 – 87,7 (100% - 60,2)
0,5	799,2 – 1006,2 (100% - 890,2)	634,8 – 1266,9 (100% - 924)
1	99,2 – 114,1; 1070,9 – 1416,8 (59,5% - 101; 40,5% - 1163,7)	99,2 – 131,2 (99,9% - 103,6)
2	44 – 52,2; 793,6 – 1115,2 (53,4% - 47; 46,6% - 976,2)	44 – 61,9 (100% - 47,2)
5	43,9 – 87,6; 349 – 877,1 (50,2% - 60,3; 45,8% - 574,5)	43,9 – 110,3 (100% - 50,9)
7	578,6 – 685,9 (100% - 647,8)	488,1 – 813 (100% - 668,6)
24	41,8 – 85,6; 340 – 868,1 (51,1% - 64,3; 46,7% - 576,5)	40,5 – 111,4 (100% - 51,4)

a – Distribuição obtida antes da permeação de cafeína pura em água

i – Distribuição para a solução de cafeína pura em água imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Observou-se que à 20 atm, a pressão exerce grande impacto nas partículas, reduzindo drasticamente seu tamanho, com posterior reestruturação.

### 5.7.2 Lipossomas elásticos incorporando cafeína

Dados de permeação para lipossomas elásticos incorporando cafeína são apresentados nas Figuras 55, 56 e 57 e Tabelas 35, 36 e 37. Para a permeação na pressão de 2,5 atm, verificou-se uma distribuição larga de tamanhos de partículas. A análise por número revela a predominância de partículas pequenas, da ordem de 60 nm, que quando comparadas com a análise por número da permeação dos lipossomas elásticos vazios, cuja predominância foi de partículas pequenas da ordem de 10 nm, justifica a hipótese anterior, de que a cafeína estaria também incorporada nas micelas de PEG-8L.

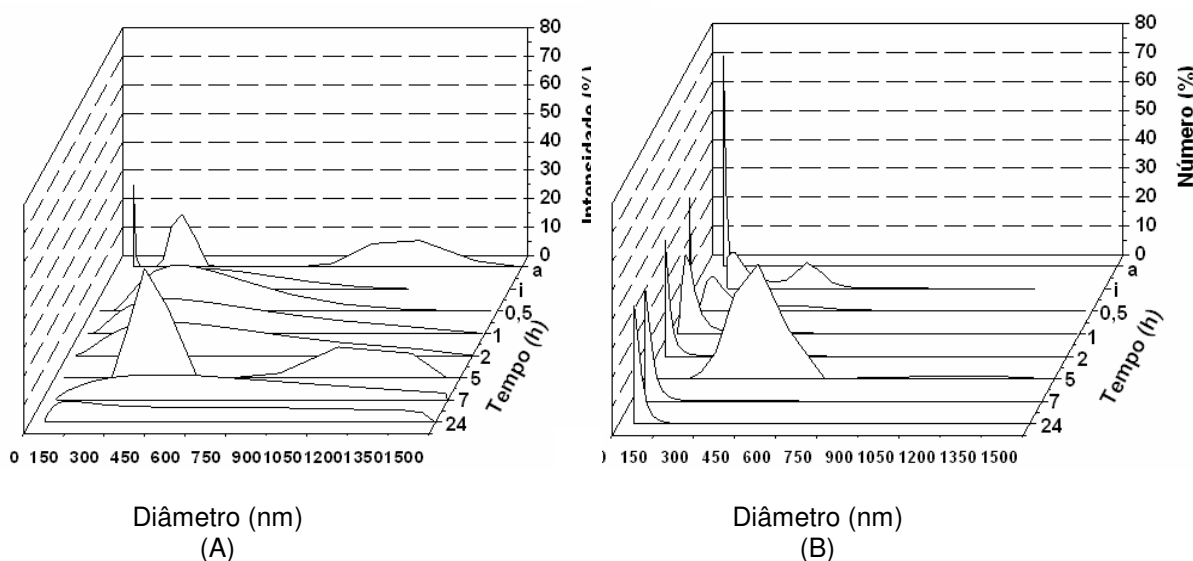


Figura 55 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição dos tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % de PEG-8L) incorporando cafeína, para permeação em 2,5 atm e 37<sup>o</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

- a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína.
- i – Distribuição para lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, imediatamente após a permeação de toda a amostra.



Tabela 35 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, após permeação na pressão de 2,5 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	62,3 – 73,8; 172,8 – 341,2; 798,7 – 1330,4 (32,2% - 63,5; 46,9% - 238,8; 20,9% - 1054,3)	62,3 – 87,5; 204,8 (99,8% - 65,5)
i	124,5 – 1126,2 (100% - 380,1)	124,5 – 834 (69,4% - 173,8; 29% - 411,8; 1,6% - 721,2)
0,5	93 – 1172,4 (100% - 366,6)	29,4 – 37; 73,9 – 931,2 (51,5% - 31,3; 42,3% - 134,9; 6,2% - 428,7)
1	48,5 – 1220,2 (100% - 406,4)	38,5 – 611,4 (98,7% - 77,1; 1,3% - 429,6)
2	32,5 – 1297,3 (100% - 419,9)	32,5 – 516,3 (99,7% - 44,8)
5	263,3 – 1320,4 (79,1% - 345,8; 20,9% - 1142,4)	209,1 – 525,5; 833 – 1320,4 (97,9% - 391,7; 2,1% - 1135,4)
7	51,4 – 1490 (100% - 500,4)	51,4 – 568,6 (99,4% - 68)
24	56,1 – 1490 (100% - 550,7)	56,1 – 507,9 (99,6% - 71,5)

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína.

i – Distribuição para lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, imediatamente após a permeação de toda a amostra.

A distribuição de tamanhos e diâmetro médio para permeação a 12 atm foi apresentada na Figura 56 e Tabela 36. Observou-se um estreitamento na distribuição de tamanhos em termos de intensidade de luz, com redução do número de populações após a permeação e diâmetro médio de 200 nm, com predominância das partículas menores (número). Em 24 horas, observou-se aumento considerável do tamanho das partículas, com distribuições semelhantes tanto em intensidade quanto em número, com diâmetro médio em torno de 450 nm. Como esse diâmetro não foi verificado em dispersões de lipossomas vazios, e sim em solução de cafeína pura, pode-se inferir que houve migração da cafeína para o meio, desta forma, posterior agregação. Os valores elevados de diâmetro médio, tanto em termos de intensidade de luz espalhada como em termos de número, sugerem que existe migração da cafeína para o meio, com formação de agregado.

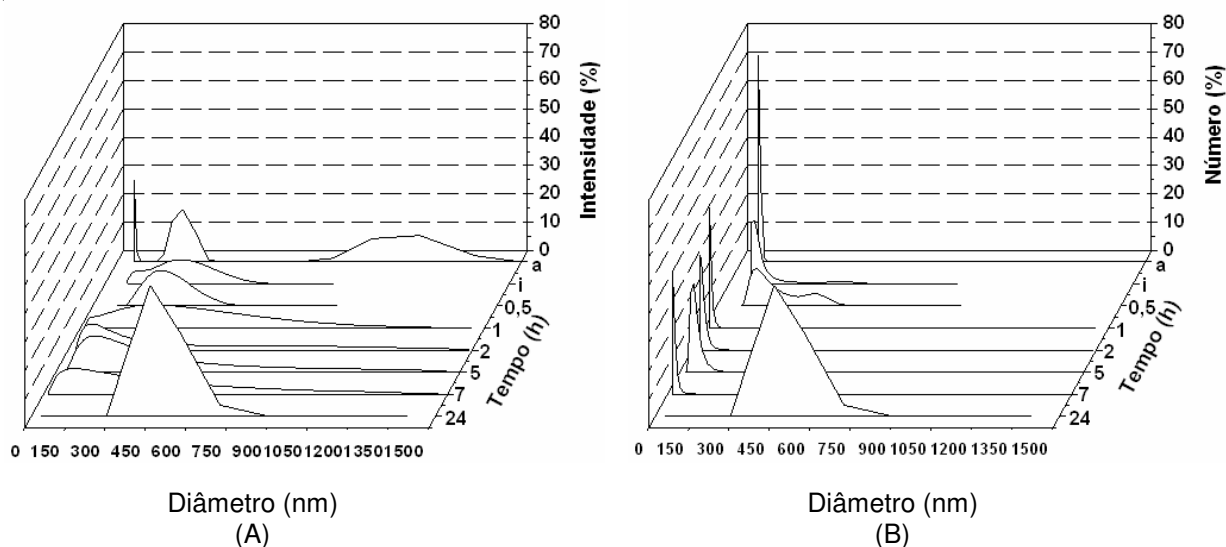


Figura 56 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, para permeação em 12 atm e 37<sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

- a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína
- i – Distribuição para lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 36 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, após permeação na pressão de 12 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	62,3 – 73,8; 172,8 – 341,2; 798,7 – 1330,4 (32,2% - 63,5; 46,9% - 238,8; 20,9% - 1054,3)	62,3 – 87,5; 204,8 (99,8% - 65,5)
i	84,8 – 568,3 (100% - 246,1)	84,8 – 514,2 (96,9% - 110,2; 3,1% - 396,2)
0,5	122,6 – 550,3 (100% - 264,6)	110,9 – 497,9 (85,1% - 191,7; 14,9% - 395)
1	18,7 – 1254,4 (100% - 251,2)	18,7 – 76 (100% - 23,5)
2	30,7 – 1296,6 (100% - 190,1)	30,7 – 119,9 (100% - 40)
5	41,2 – 1400 (100% - 243,5)	32,7 – 206,6 (99,9% - 54,7)
7	18,8 – 1190,3 (100% - 216,5)	18,8 – 94,4 (100% - 24,5)
24	441,4 – 555,7 (97,4% - 535,4)	350,6 – 699,7 (100% - 465,6)

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína

i – Distribuição para lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, imediatamente após a permeação de toda a amostra.

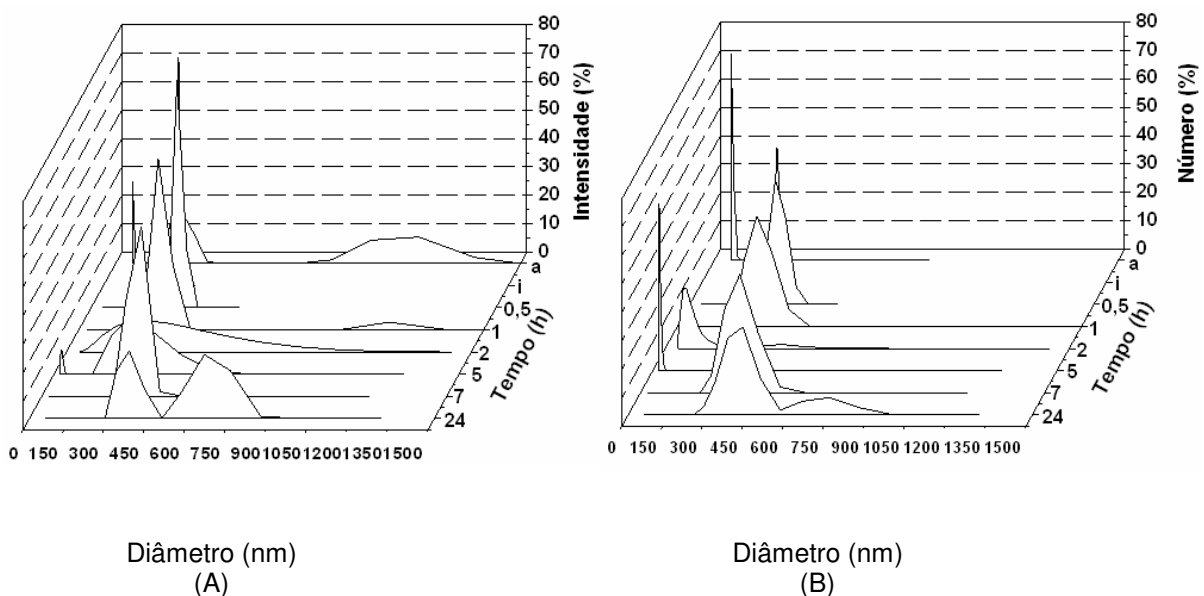


Figura 57 – Influência do tempo no diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, para permeação em 20 atm e 37<sup>0</sup> C, durante 24 horas, em termos de (A): intensidade de luz espalhada e (B): número de partículas.

- a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína.
- i – Distribuição para lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, imediatamente após a permeação de toda a amostra.

Tabela 37 - Distribuições de tamanhos dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, após permeação na pressão de 20 atm e 37<sup>0</sup> C, determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas.

<b>Distribuição de Tamanhos (nm)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>Intensidade (Diâmetro médio)</b>	<b>Número (Diâmetro médio)</b>
a	62,3 – 73,8; 172,8 – 341,2; 798,7 – 1330,4 (32,2% - 63,5; 46,9% - 238,8; 20,9% - 1054,3)	62,3 – 87,5; 204,8 (99,8% - 65,5)
i	278,4 – 289,8 (100% - 279,6)	267,6 – 3001,5 (100% - 279,7)
0,5	317,6 – 354,5 (100% - 325)	284,6 – 395,6 (100% - 327,4)
1	248,7 – 349,4; 1149,2 (97,3% - 300,1; 2,7% - 1149,2)	209,8 – 414,2; 1149,2 (99,9% - 301)
2	56,4 – 1204,4 (100% - 322,7)	47,6 – 723,1 (96,4% - 89; 3,6% - 430,9)
5	23,6 – 35,3; 143,2 – 581,5 (18,8% - 28,2; 77,6% - 304,6)	23,6 – 43,1 (100% - 26,4)
7	310,9 – 436,8 (94,4% - 349,3)	262,2 – 517,8 (99,8% - 362,4)
24	32107 – 857 (50,7% - 365,4; 49,3% - 667,9)	279,7 – 857 (85,2% - 402; 14,8% - 712,8)

a – Distribuição obtida antes da permeação dos lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína

i – Distribuição para lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, imediatamente após a permeação de toda a amostra.

## 5.8 Teor de Fosfato após a Permeação

Os teores de fosfato quantificados após a permeação, são apresentados na Tabela 38 para as várias pressões.

Tabela 38 – Teor de fosfolipídio para os lipossomas elásticos (40 % PEG-8L) incorporando cafeína, após permeação em membranas de policarbonato com poros de 30 nm de diâmetro, em pressões de 2,5; 12 e 20 atm.

Lipossomas	Pressão (atm)	$\text{PO}_4^{-3}$ (mmol.L <sup>-1</sup> ) (inicial)	$\text{PO}_4^{-3}$ (mmol.L <sup>-1</sup> ) (final)	Permeado (%)
E (40 % PEG-8-L) + Cafeína (membrana sintética)	2,5	0,600	0,0956	15,93
	12		0,2385	39,75
	20		0,2522	42,03

Os valores apresentados mostram aumento da quantidade permeada de fosfolipídios com o aumento da pressão. Comparando com os resultados da permeação com lipossomas vazios de mesma proporção de PEG-8L (Tabela 25) observou-se redução do teor de fosfato permeado para as pressões de 2,5 e 20 atm, e curiosamente, aumento do teor de fosfato permeado para a pressão de 12 atm, demonstrando a resistência imposta pela presença da cafeína nas partículas nas pressões extremas. Por outro lado, os aglomerados de cafeína, de tamanho cerca de 100 vezes maior que o poro nominal da membrana, tem notável efeito estérico, obstruindo os poros da membrana e impedindo a passagem das partículas (lipossomas e micelas).

## 5.9 Reologia das Dispersões de Lipossomas Elásticos contendo Cafeína Incorporada

Nesse item, serão feitas considerações sobre a reologia da cafeína pura em água e das dispersões de lipossomas convencionais e elásticos (preparados a

partir de 40% de PEG-8L) incorporando cafeína, em membranas de policarbonato e em pele de orelha de porco dermatomizada, em função das pressões de 2,5; 12 e 20 atm.

A Figura 58 mostra o comportamento da vazão *versus* queda de pressão para as dispersões estudadas.

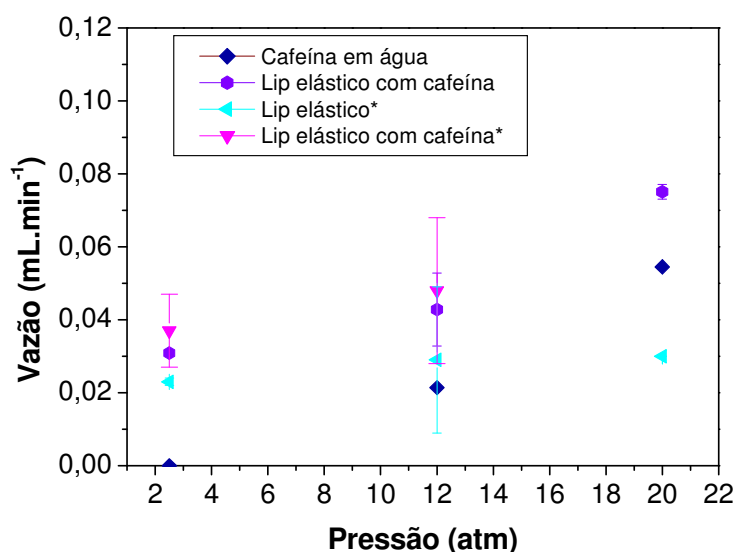


Figura 58 – Dados de vazão *versus* queda de pressão para permeação de cafeína pura em água e das dispersões de lipossomas elásticos com 40 % de PEG-8-L incorporando cafeína.

\*Dados obtidos em pele de orelha de porco dermatomizada

Nos ensaios em membranas sintéticas, as vazões obtidas para a cafeína em solução lipossomal foram maiores que para a cafeína livre, demonstrando que a dispersão lipossomal promove a permeação da cafeína nas várias pressões. No entanto, essas vazões são menores que das dispersões de lipossomas elásticos vazios (Figura 51), indicando que a incorporação da cafeína reduz a capacidade de deformação dos lipossomas elásticos.

Quando comparadas às vazões obtidas para os lipossomas elásticos com 40 % de PEG-8L para permeações em membranas sintéticas, observa-se que as vazões obtidas em pele de orelha de porco dermatomizadas foram muito baixas,

demonstrando a muito maior resistência ao escoamento da matriz porosa da pele, em relação às membranas de policarbonato.

Nos ensaios de permeação onde a cafeína foi incorporada nos lipossomas elásticos com 40% de PEG-8L, observou-se valores maiores de vazão para permeação realizada em pele de orelha de porco dermatomizada. Isso pode ser explicado pela interação entre os lipídios formadores das vesículas lipossomais com os componentes lipídicos presentes na estrutura da pele.



## 6.0 CONCLUSÕES

---

Da análise dos resultados experimentais obtidos pôde-se concluir que:

✓ Lipossomas convencionais são capazes de incorporar PEG-8L por incubação, produzindo lipossomas elásticos. A incorporação depende da distribuição do PEG-8L entre as vesículas e suas micelas dispersas no meio, e é maior para menores concentrações iniciais de PEG-8L.

✓ A incorporação de PEG-8L produz um halo expandido na superfície dos lipossomas.

✓ A presença do PEG-8L nas dispersões reduz a tensão superficial, sendo a redução mais expressiva para concentração inicial de PEG-8L da ordem de 40% molar.

✓ O diâmetro dos lipossomas elásticos é aproximadamente o dobro dos convencionais. Porém, a dispersão de lipossomas com PEG-8L incorporado apresenta distribuição mais larga, devido à presença das micelas de PEG-8L no meio.

✓ A morfologia dos lipossomas convencionais e elásticos é aproximadamente esférica, apresentando deformações, características da fluidez da bicamada lipídica produzida pela lecitina de ovo, que à temperatura ambiente encontra-se na fase líquido-cristalina.

✓ A reologia dos lipossomas elásticos através de dados de vazão *versus* queda de pressão, mostrou que o coeficiente de permeação dos lipossomas elásticos em membranas de policarbonato é da mesma ordem de grandeza que o correspondente da água, demonstrando a sua capacidade de deformação e escoamento através dos nanoporos das membranas. O coeficiente de

permeabilidade dos lipossomas convencionais foi 10 vezes menor que o dos elásticos.

✓ A quantificação do teor de fosfato no permeado mostrou a superioridade da permeação dos lipossomas elásticos em relação aos convencionais. Nas pressões de 2,5 e 12 atm, o teor de fosfato permeado foi diretamente proporcional à incorporação de PEG-8L (maior para os lipossomas preparados a partir de 25% de PEG-8L). À pressão de 20 atm, o teor de fosfato indica a permeação total das vesículas.

✓ A tensão de ruptura da bicamada lipídica calculada para os lipossomas convencionais é semelhante à dos lipossomas elásticos, mostrando que a inserção de PEG-8L não reduz a resistência da membrana a qual depende somente da sua composição de lipídios.

✓ O modelo clássico de escoamento de fluidos através de membranas que considera a lei de Darcy, representou com boa aproximação o escoamento da água em membranas de nanoporos.

✓ O modelo de membrana adaptado para o escoamento de vesículas deformáveis representou com boa precisão o escoamento de lipossomas elásticos na faixa de pressões de 8 a 18 atm. Porém esse modelo não representou o escoamento dos lipossomas convencionais.

✓ A permeação de lipossomas convencionais resultou em transições de formas, avaliadas através de diâmetro e distribuição de tamanhos imediatamente após a permeação e ao longo de 24 horas, indicativa de rompimento das vesículas.

✓ A transição de formas dos lipossomas elásticos, avaliada através do diâmetro e distribuição de tamanhos indicou que os lipossomas sofreram contração imediatamente após a permeação, adquirindo um diâmetro médio ao longo de 24 horas maior do que antes da permeação, como resultado da sua recuperação após o fim da aplicação da pressão. A predominância das micelas de PEG-8L dificulta a avaliação dos tamanhos em termos de número, e, conseqüentemente a análise do diâmetro médio das vesículas. O efeito do aumento de tamanho ao longo das 24 horas é mais pronunciado para os lipossomas elásticos com 25 % de PEG-8L para todas as pressões avaliadas.

✓ A mudança de morfologia após a permeação, avaliada através das imagens de microscopia eletrônica de transmissão, mostra claramente a deformação acentuada sofrida pelos lipossomas preparados a partir de 40% de PEG-8L, da forma esférica para uma forma alongada indicando que no interior do poro as vesículas adquirem forma semelhante à de um esfero-cilindro.

✓ Valores de tamanhos das partículas dos lipossomas elásticos com 40 % de PEG-8L, imediatamente após a permeação e na pressão de 2,5 atm e conseqüente aumento da tensão superficial, juntamente com micrografias realizadas nas mesmas condições, mostram que a passagem das vesículas nos poros das membranas pode favorecer a incorporação do PEG-8L na bicamada lipídica, reduzindo a quantidade de PEG-8L livre.

✓ O conjunto das caracterizações em termos de diâmetro, morfologia e tensão superficial, demonstra a elasticidade dos lipossomas incorporando PEG-8L.

✓ Os lipossomas convencionais e elásticos com 25% e 40 % de PEG-8L foram capazes de incorporar cafeína com rendimento de 11,0; 41,87 e 39,9 %, respectivamente. No caso de lipossomas elásticos a maior incorporação da

cafeína é um indicativo da sua distribuição tanto nas vesículas quanto nas micelas de PEG-8L.

✓ Embora os lipossomas elásticos tenham se mostrado promotores da permeação, nos ensaios onde a cafeína foi incorporada nos lipossomas elásticos com 40% de PEG-8L, a presença desta reduziu acentuadamente a permeação dos lipossomas elásticos em membranas sintéticas observando-se valores maiores de vazão para permeação realizada em pele de orelha de porco dermatomizada. Isso pode ser explicado pela interação entre os lipídios formadores das vesículas lipossomais com os componentes lipídicos presentes na estrutura da pele.

## 7.0 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

---

- Realizar micrografias para lipossomas convencionais após a permeação, em diferentes pressões, para observação de sua deformação e/ou ruptura.
- Estudar a incorporação de outras substâncias tensoativas com diferentes estruturas, assim como da mistura de diferentes tensoativos, nos lipossomas.
- Realizar micrografias para as amostras estudadas neste trabalho para avaliar a morfologia das partículas ao longo do tempo.
- Acompanhar a variação da tensão superficial para os lipossomas incorporando cafeína, antes e após a permeação.
- Incorporar cafeína, em concentrações diferentes das concentrações avaliadas neste trabalho, em lipossomas convencionais e lipossomas elásticos com 25% e 40% de PEG-8L.
- Realizar micrografias de lipossomas incorporando cafeína e de cafeína pura como controle, para observação de sua distribuição nas vesículas e micelas de PEG-8L.
- Realizar estudos das interações moleculares entre cafeína, tensoativos e fosfolípidios através de monocamadas de Langmuir.

## 8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. **TRENDS in Plant Science**, v.6, n.9, p.407-413, 2001.
- BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, p. 238, 1965.
- BIOTOL. **Product Recovery in Bioprocess Technology**. Butterworth-Heinemann, 1992.
- BARBOSA. R. M. **Preparação e caracterização de lipossomas elásticos e elástico-magnéticos para administração transdérmica de moléculas bioativas**. Campinas, 2005. 154p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas).
- BOUWSTRA, J. A.; VAN DER BERGH, B. A. I.; JUNGINGER, H. E.; VROOM, J.; GERRITSEN, H. Interactions of elastic and rigid vesicles with human skin in vitro: electron microscopy and two – photon excitation microscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1461 p. 155 – 173, 1999.
- BOUWSTRA, J., A., HONEYWELL-NGUYEN, P.L, GOORIS, G.S. e PONEC, M. “Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations”. **Progress Lipid Research**, v.42, p.1-36, 2003.
- BOUWSTRA, J. A.; DE GRAAFF, A.; GROENINK, WJ.; HONEYWELL-NGUYEN, P.L. Elastic vesicles: interaction with human skin and drug transport. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.7, n.2, p.222–223, 2002.
- BOUWSTRA, J. A.; VAN HAL, D. A.; HOFLAND, H.E.J.; JUNGINGER, H.E. Preparation and characterization of nonionic surfactant vesicles. **Colloids and Surfaces A – Physicochemical and Engineering Aspects**, v.123, p.71–80, 1997.

- BREZESINSKI, G.; MÖHWALD, H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science.**, v.100, p.563-584, 2003.
- BROCKMAN, H. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions. **Current Opinion in Structural Biology**, v.9, p.438-443, 1999.
- BRUINSMA, R. Rheology and shape transitions of vesicles under capillary flow. **Physica A**, v. 234, p.249-270, 1996.
- CEVC, G.; SCHÄTZLEIN, A.; RICHARDSEN, H. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1564, n.1, p.21–30, 2002.
- CEVC, G. **Transfersomes**. European Patent number, 91 114 163 8 – 2114, 1991.
- CEVC, G.; BLUME G. "Lipid vesicle penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force" **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1104, p.226-232, 1992.
- CEVC, G. Eletrostatic characterization of liposomes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.64, n.1-3, p.163-186, 1993.
- CEVC, G. Material transport across permeability barriers by means of lipid vesicles. In: LIPOWSKY, R.; SACKMANN, E> eds, **Structure and dynamics of membranes**. Amsterdam: Elsevier, cap. 9, p. 467-490, 1995a.
- CEVC, G.; SCHÄTZLEIN, A.; BLUME , G. Trasdermal drug carries proprieties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides. **Journal of Controlled Release**, v. 36, p.3 – 16, 1995b.
- CEVC, G.; BLUME , G.; SCHÄTZLEIN, A.; GEBAUER, D.; PAUL, A. The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, p.349 – 378, 1996.

- CEVC, G.; SCHÄTZLEIN, A.; BLUME, G. Transfessomes – mediated transepidermal delivery improve the region – specificity and biological activity of corticosteroids in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 45, p.211-226, 1997.
- CEVC, G., GEBAUER, D., STIEBER, J., SCHÄTZLEIN, A., BLUME, G., Ultraflexible vesicles, Transfesomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1368, p. 201 – 215, 1998.
- CEVC, G.; BLUME, G. New, highly formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1514, p. 191-205, 2001.
- CEVC, G., SCHÄTZLEIN, A. Ultraderformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1564, p.21– 30, 2002.
- CEVC, G.; GEBAUER, D. Hydration – driven transport of deformable lipid vesicles through fine pores and the skin barrier. **Biophysical Journal**, v.84, p. 1010 – 1024, 2003.
- CEVC, G.; SEDDON, J.M.; MARSH, D. The mechanism of regulation of membrane phase-behavior, structure and interactions by lipid headgroups and electrolyte solution. **Faraday Discussions**, v.81, p. 179 – 189, 1986.
- CEVC, G., SCHÄTZLEIN, A. G.; RICHARDSEN, H.; VIERL, U. Overcoming semipermeable barriers, such as the skin, with ultradeformable mixed lipid vesicles, transfersomes, liposomes, or mixed lipid micelles. **Langmuir**, v.19, p.10753–10763, 2003.
- CHEN, P.S., TORIBA, T.Y., WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. **Analytical Chemistry**, v.28, p.1756–1758, 1956.
- CROMMELIN, D.J.A.; SCHREIER, H. Liposomes. In: KREUTER, J. **Colloidal drug delivery systems**. New York: M. Dekker, 1994. cap.3, p.73-189.



- CROMMELIN, D. J. A.; SCHREIER, H. **Colloidal Drug Delivery Systems: Lipossomes**. Chap. 3 p.73-189 Ed. Jorg Kreuter., 1994.
- DANIELS, R. **Galenic principles of modern skin care products**. 2001. Disponível em [http://www.scf-online.com/english/25\\_e/galenic\\_25\\_e.htm](http://www.scf-online.com/english/25_e/galenic_25_e.htm). Acesso em 04 de outubro de 2006.
- DEMEL, R.A.; VAN KESSEL GEURTS, W.S.M.; ZWAAL, R.F.A.; ROELOFSEN, B.; VAN DEENEN, L.L.M. Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**, v.406, n.1, p.97-107, 1975.
- EVANS, S. M.; GRIFFITHS, R. R. Caffeine withdrawal: a parametric analysis of caffeine dosing conditions. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.289, n.1, p. 285-294,1999.
- FADDA, A.M.; BAROLI, B.M.; MACCIONI, A.M.; SINICO, C.; VALENTI, D.; ALHAIQUE, F. Phospholipid-detergent systems: effects of polysorbates on the release of liposomal caffeine. **Il Farmaco**, v.53, p. 650-654, 1998.
- FARRELL, S.; SIRKAR, K.K. A reservoir-type controlled release device using aqueous-organic partitioning and a porous membrane. **Journal of Membrane Science**, v.130, n.1, p. 265-274, 1997.
- FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 2003. 736 p.
- FRISKEN, B. J.; ASMAN, C.; PATTY, P. J. Studies of vesicle extrusion. **Langmuir**, v. 16, p. 928-933, 2000.
- GOLDEN, G.M.; GUZEK, D.B.; KENNEDY, A.H.; MCKIE, J.E.; POTTS, R.O. Stratum corneum lipid phases transitions and water barrier properties. **Biochemistry, Columbus**, v. 26, p. 2382 – 2388, 1987.
- GRIFFITHS, R. R.; WOODSON, P. P.; Caffeine physical dependence: a review of human and laboratory animal studies. **Psychopharmacology**, v.94, n.4, p.437-451, 1988.

- HANUS, L.H.; PLOEHN, H.J. Conversion of intensity-averaged photon correlation spectroscopy measurements to number-averaged particle size distributions. 1. theoretical development. **Langmuir**, v.15, p.3091-3100, 1999.
- HOFLAND, H.E.J.; BOUWSTRA, J. A.; PONEC, M.; BODDE, H.E.; SPIES, F.; VERHOEF, J.C.; JUNGINGER, H. E. Interactions of nonionic surfactant vesicles with cultured keratinocytes and human skin *in vitro* – a survey of toxicological aspects and ultrastructural-changes in stratum-corneum. **Journal of Controlled Release**, v.16, n.1-2, p.155–167, 1991.
- HOFLAND, H.E.J.; BOUWSTRA, J. A.; TALSMA, H.; SPIES, F.; JUNGINGER, H. E. Characterization of non-ionic surfactant vesicles – structure, size and stability. **Pharmaceutisch Weekblad – Scientific Edition**, v.10, n.2, p.98–98, 1988.
- HONEYWELL-NGUYEN, P.L.; DE GRAAFF, A.M.; GROENINK, H.W.W.; BOUWSTRA, J.A. The in vivo and in vitro interactions of elastic and rigid vesicles with human skin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1573, p.130–140, 2002a.
- HONEYWELL-NGUYEN, P.L.; FREDERIK, P.M.; BOMANS, P.H.H.; JUNGINGER, H.E.; BOUWSTRA, J.A. Transdermal delivery of pergolide from surfactant-based elastic and rigid vesicles: characterization and *in vitro* transport studies. **Pharmaceutical Research**, v.19, v.7, p.991–997, 2002b.
- HONEYWELL-NGUYEN, P.L.; VAN DEN BUSSCHE, M.H.; JUNGINGER, H.E.; BOUWSTRA, J.A. The effect of surfactant-based elastic and rigid vesicles on the penetration of lidocaine across human skin. **STP Pharma Sciences**, v.12, n.4, p.257–262, 2002c.
- HONEYWELL-NGUYEN, P.L., BOUWSTRA, J.A. The in vitro transport of pergolide from surfactant-based elastic vesicles through human skin: a suggested mechanism of action. **Journal of Controlled Release**, v.86, p.145–156, 2003.
- HONEYWELL-NGUYEN, P.L.; GROENINK, H.W.W.; DE GRAAFF, A.M.; BOUWSTRA, J.A. The in vivo transport of elastic vesicles into human skin:

- effects of occlusion, volume and duration of application. **Journal of Controlled Release**, v.90, n.2, p.243–255, 2003a.
- HONEYWELL-NGUYEN, P.L., ARENJA, S., BOUWSTRA, J.A. Skin penetration and mechanisms of action in the delivery of the D2-Agonist rotigotine from surfactant-based elastic vesicle formulations. **Pharmaceutical Research**, v.20, n.10, p.1619–1625, 2003b.
- HONEYWELL-NGUYEN, P.L., GOORIS, G.S., BOUWSTRA, J.A. Quantitative assessment of the transport of elastic and rigid components and a model drug from these vesicle formulations into human skin *in vivo*. **Journal of Investigative Dermatology**, v.123, n.5, p.902–910, 2004.
- HONEYWELL-NGUYEN, P.L.; GROENINK, H.W.W.; BOUWSTRA, J.A. Elastic vesicles as a tool for dermal and transdermal delivery. **Journal of Liposome Research**, v.16, n.3, p.273–280, 2006.
- HUANG, C.; LI, S. Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta – Reviews on Biomembranes**, v.1422, n.3, p.273-307, 1999.
- HUGHES, J. R. **Caffeine withdrawal, dependence, and abuse**. In: WIDIGER, T. A. et al. DSM- IV Sourcebook. American Psychiatric Association, Washington, DC, EUA, 1994.
- HUNTER, D.G.; FRISKEN, B.J. Effect of Extrusion Pressure and Lipid Properties on the Size and Polydispersity of Lipid Vesicles. **Biophysical Journal**, v.74, p.2996-3002, 1998
- IDSON, B. Percutaneous absorption. **Journal Pharmaceutical Science**, v.64, n.6 p.901-924, 1975.
- ISRAELACHVILI, J. **Intermolecular & Surface Forces**. London: Academic Press. 2 ed. 1991. 451 p.

- JOHANNSEN, M.; BRUNNER, G. Solubility of the xanthines caffeine, theophylline and theobromine in supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v.95, p.215-226, 1994.
- KIM, C.; SHIM, J.; HAN, S.; CHANG, I. The skin-permeation-enhancing effect of phosphatidylcholine: caffeine as a model active ingredient. **Journal of Cosmetic Science**. V. 53, n. 6, p. 363-374, 2002.
- KOPCAK, U. **Extração de Cafeína das sementes da planta do guaraná (*Paullinia cupana*) com dióxido de carbono supercrítico e co-solventes**. Campinas, 2003. 237p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2003.
- LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II Liquids. **Journal American Chemical Society**, v.56, p.1848-1906, 1917.
- LASIC, D. D. **Lipossomes: from physics to applications**. Londres: Elsevier, 1993. 575p.
- LEONARDI, G. R. **Cosmetologia Aplicada**. São Paulo: Livraria e editora Medfarma, 2004.
- LI, S.; HARTLAND, S. Influence of co-solvents on solubility and selectivity in extraction of xanthines and cocoa butter from cocoa beans with supercritical carbon. **Journal of Supercritical Fluids**, v.5, p.7-12, 1992.
- LI, X.M.; MOMSEN, M.M.; SMABY, J.M.; BROCKMAN, H.L.; BROWN, R.E. Cholesterol decreases the interfacial elasticity and detergent solubility of sphingomyelins. **Biochemistry**, v.40, p.5954-5963, 2001.
- LIBERMANN, H.; WURTMAN, R. J.; EMDE, G. G.; ROBERTS, C.; COVIELLA, I. L. G. The effects of low doses of caffeine on human performance and mood. **Psychopharmacology**, p.308-312, 1987.
- MAGDASSI, S. Delivery Systems in Cosmetics. **Colloids Surface**, v.123-124, p.671-679, 1997.

- MARJUKKA SUHONEN T.; BOUWSTRA J.A.; URTTI A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **Journal Controlled Release**, v.59, n.2, p. 149–161, 1999.
- MARTIN, A.; PARUTA, A. N.; ADJEI, A. Extended Hildebrand solubility approach: methylxantines in mixed solvents. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.70, n.10, p.1115-1120, 1981.
- MCKILLOP, A. **An introduction to the chemistry of the alkaloids**. Londres: Butterworths, p. 1-41. 1970.
- NEW, R.R.C. **Liposomes, a Practical Approach**. 2.ed. Oxford, IRL Press, 1990.
- PATTY, P.J.; FRISKEN, B.J. Direct determination of the number-weighted mean radius and polydispersity from dynamic light-scattering data. **Applied Optics**, v.45, n.10, p.2209-2216, 2006.
- PAUL, A.; CEVC, G.; BACHHAWAT, B.K. Transdermal Immunisation with an integral membrane component, gap junction protein, by means of ultradeformable drug carriers, transfersomes. **Vaccine**, v16, n.2/3, p. 188–195, 1998.
- PELLETIER, S. W. Research in the chemistry of diterpenoid alkaloids. **Pure and Applied Chemistry**, v.69, n.1, p.119-124, 1997.
- PRAUSNITZ, M.R. Transdermal delivery of macromolecules: recent advances by modification of skin's barrier properties. In: Título livro, cap. 8, p.124–153, 1997.
- RIBAS, A. M. **Estudo da estabilidade de bicamadas lipídicas em presença de tensoativos**. Campinas, 1997. 92p. (Dissertação de Mestrado–Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas).
- RIBOSA, I.; GARCIA, M. T.; PARRA, J. L.; de la MAZA, A.; SANCHEZ-LEAL, J.; TRULLAS, C.; TSI, A.; BALAGUER, F.; PELEJERO, C. Physico-chemical modifications of liposome structures through interaction with surfactants. **International Journal of Cosmetic Science**, v.14, p. 131-149, 1992.

- ROTENBERG, Y.; BORUVKA, L.; NEUMANN, A.W. Determination of surface tension and contact angle from the shapes of axisymmetric fluid interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.93, n.1, p.169-183, 1983.
- SCHERECK, J. O. **Organic chemistry concepts and applications**. The C.V. Mosby Company copyright, EUA, p.259-327, 1975.
- SCHREIER, H.; BOUWSTRA, J.A. Liposomes and niosomes as topical drug carrier: dermal and transdermal drug delivery. **Journal of Control Release**, v. 30, p. 1-15, 1994.
- SLATTERY, J.C. **Momentum, Energy and Mass Transfer in Continua**, New York: McGraw Hill, 1972.
- STRAIN, E. C.; MUMFORD, G. K.; SILVERMAN, K.; GRIFFITHS, R. R. Caffeine dependence syndrome. Evidence from case histories and experimental evaluations. **JAMA**, v.272, n.13, p.1043-1048, 1994.
- TORRE, L.G. **Desenvolvimento de vacina gênica veiculada em adjuvantes lipídicos para tratamento da tuberculose**. Tese de Doutorado apresentada na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas. 2006.
- TOUITOU, E.; SHACOEZRA, N.; DAYAN, N.; JUSHYNSKI, M.; RAFAELOFF, R.; AZOURY, R. Dyphylline liposomes for delivery to the skin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.81, n.2, p.131-134, 1992.
- UNIVERSITY of ROCHESTER. **Ultra-deformable liposomes "Transfersomes®"**. Disponível em: <http://mail.rochester.edu/cq001m/bme/future.html>. Acesso em: 21 março 2005.
- VAN DEN BERGH, B.A.I.; VRIES I.S.; BOUWSTRA J.A. Interactions between liposomes and human stratum corneum studied by freeze-substitution electron microscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v.167, p.57–67, 1998.
- VAN DEN BERGH, B.A.; BOUWSTRA, J.A.; JUNGINGER, H.E.; WERTZ, P.W. Elasticity of vesicles affects hairless mouse skin structure and permeability. **Journal of Controlled Release**, v.62, n.3, p. 367–379, 1999.
- VAN DEN BERGH, B. A. I.; BOUWSTRA, J. A.; JUNGINGER, H. E.; WERTZ, P. W. Elasticity of vesicles assessed by electron spin resonance, electron

- microscopy and extrusion measurements. **International Journal of Pharmaceutics**, v.217, n.1-2, p.13–24, 2001.
- VAN DEN BERGH, B. A. I.; BOUWSTRA, J. A.; JUNGINGER, H. E.; WERTZ, P. W. Elasticity of vesicles affects hairless mouse skin structure and permeability. **Journal of Controlled Release**, v.62, n.3, p.367–379, 1999.
- VAN HAL, D. A.; BOUWSTRA, J. A.; VANRENSEN, A.; JEREMIASSE, E.; DE VRINGER, T.; JUNGINGER, H.E. Preparation and characterization of nonionic surfactant vesicles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.178, n.1, p.263–273, 1996.
- WELTY, J. R., WICKS, C. E., WILSON, R. E. **Fundamentals of Momentum, Heat and Mass Transfer**, John Wiley & Sons, Inc. 4<sup>a</sup> edição, 2001.
- WELLS, T.; BASKETTER, D. A.; SCHRÖDER, K. R. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. **Toxicology in Vitro**, v.18, p. 231-243, 2004.
- WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity – in vivo study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.56, p. 67-62, 2003.
- ZANIQUELLI, M.E.D.; BUENO, W.A.; HOMEM, A.J.M. Construção de uma cuba de Lagmuir para preparação e estudo de monocamadas líquidas. **Química Nova**, v. 16, n.3, p. 229-233, 1993.
- <http://www.avantilipids.com>, 2004.

### Curva de calibração de cafeína pura em água

